

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Sección departamental de Fisiología
(Fisiología Animal)



TESIS DOCTORAL

Efectos de la administración exógena de rhGH y de la ingesta de dietas con lactoalbúmina sobre el perfil lipídico, la actividad paraoxonasa y parámetros ponderales en ratones BALB/c adultos y viejos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Wilma Villaro García

Director

Ángel Agis Torres

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE FISIOLÓGÍA



**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE rhGH Y DE LA INGESTA
DE DIETAS CON LACTOALBÚMINA SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO, LA
ACTIVIDAD PARAOXONASA Y PARÁMETROS PONDERALES EN RATONES
BALB/c ADULTOS Y VIEJOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Wilma Villaro García

Director: Dr. Ángel Agis Torres

Madrid, 2015

TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE rhGH Y DE LA INGESTA
DE DIETAS CON LACTOALBÚMINA SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO, LA
ACTIVIDAD PARAOXONASA Y PARÁMETROS PONDERALES EN RATONES
BALB/c ADULTOS Y VIEJOS**

Wilma Villaro García

Aspirante al grado de DOCTOR

Por la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DIRECTOR

FDO. DR. ÁNGEL AGIS TORRES

A mi familia

Agradecimientos

Deseo hacer patente mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de una forma u otra, me han apoyado en la realización de esta Tesis Doctoral y me han animado a concluirla.

Quisiera en primer lugar mostrar mi agradecimiento a mi Director el Dr. Agis Torres, por el apoyo, confianza y estímulo que desde el primer momento han mostrado para que fuese posible la realización de esta Tesis Doctoral, además he de reconocer que su dedicación ha ido mucho más allá de la labor de un Director de Tesis. Me gustaría también destacar la facilidad con la que se expresa y transmite su conocimiento.

He de agradecer al Prof. Dr. García Sacristán el permitir mi incorporación a la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Agradezco a la Dra. Muñoz Martínez por acogerme en su grupo de investigación a pesar del tiempo limitado que yo tenía para realizar la fase de experimentación. También quiero agradecer muy especialmente a la Dra. López- Oliva toda la ayuda y apoyo recibido en la realización de esta tesis.

Igualmente he de agradecer al Dr. Sánchez Montero su apoyo y sus consejos durante todos estos años y sobre todo por ser mi amigo.

Me gustaría acordarme de todos los compañeros de la Facultad con los que he compartido muchas horas, tanto las de trabajo como las de ocio, gracias a las cuales hemos creado vínculos de amistad. Han sido un gran apoyo.

A mis amigas/os de toda la vida, que aunque no los nombre, me acuerdo de todos ellos, gracias.

Mis últimas palabras de agradecimiento van dedicadas a mi madre y a mi hermana, que desde el principio me han apoyado, me han aguantado y han soportado con paciencia este trabajo y todos los duros momentos que he pasado hasta su fin. Y a Miriam, que me ayuda a olvidarme de todo lo malo que ocurre en la vida.

A todos, muchas gracias

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE	10
1.1. RESUMEN	13
1.1.1. ENGLISH ABSTRACT	15
1.1.2. RESUMEN EN ESPAÑOL	19
1.1.3. ÍNDICE DE TABLAS.....	23
1.1.4. ÍNDICE DE GRÁFICOS	27
2. INTRODUCCIÓN	31
2.1. ENVEJECIMIENTO	33
2.1.1. DEFINICIÓN DE ENVEJECIMIENTO.....	33
2.1.2. CARACTERÍSTICAS DEL ENVEJECIMIENTO	34
2.1.3. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO	36
2.1.4. MANIFESTACIONES DE LA VEJEZ.....	38
2.1.4.1. Composición corporal.....	38
2.1.4.2. Perfil lipídico	39
2.1.4.3. Paraoxonasa 1 (PON1)	40
2.1.4.4. Estado oxidativo y lipoperoxidación	43
2.2. ESTRATEGIAS ANTIVENAJECIMIENTO	50
2.2.1. HORMONA DE CRECIMIENTO COMO ESTRATEGIA ANTIVENAJECIMIENTO.....	53
2.2.1.1. Características de la hormona de crecimiento	53
2.2.1.2. Acciones de la hormona de crecimiento	60
2.2.1.3. Administración exógena de GH.....	68
2.2.2. INFLUENCIA DE LA DIETA EN EL ENVEJECIMIENTO.....	77
2.2.2.1. Efectos de la restricción energética (RE).....	77
2.2.2.2. Efectos de la proteína de la dieta	82
2.2.2.2.1 Efectos de la lactoalbúmina como ingrediente de la dieta	85
3. OBJETIVOS	87
4. MATERIAL Y MÉTODOS	91
4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	93
4.2. DIETAS EXPERIMENTALES	95
4.3. DETERMINACIONES PONDERALES Y ANALÍTICAS	100
4.3.1. Determinación de la composición corporal	102
4.3.2. Procesamiento de órganos	104
4.3.3. Procesamiento del hígado	104
4.3.4. Determinación de la muerte celular	106
4.3.5. Determinación de la peroxidación lipídica hepática	106
4.3.6. Determinación de colesterol total, HDL-colesterol y triglicéridos.....	107
4.3.7. Cálculo del índice aterogénico.	107
4.3.8. Determinación de la actividad de la paraoxonasa (PON1)	108
4.3.9. Cálculo de la razón PON1:HDL-colesterol.	108
4.3.10. Determinación de la leptina.....	108
4.3.11. Determinación de IGF-I	109
4.3.12. Determinación de glucemia	109
4.4. MÉTODOS MATEMÁTICOS Y ESTADÍSTICOS	110
5. RESULTADOS	113
5.1 EXPOSICIÓN DE RESULTADOS.....	113
5.1.1. INGESTA TOTAL (IT), INGESTA PROTEICA (IP), PESO FINAL, GANANCIA DE PESO Y EFICACIA ALIMENTARIA	115
5.1.2. DEPÓSITOS DE GRASA CORPORALES Y GRASA CORPORAL	119

5.1.3	MÚSCULOS SOLEO, BICEPS, CUADRICEPS Y GASTROCNEMIO	124
5.1.4	PROTEINA CORPORAL ABSOLUTA Y PORCENTUAL Y RELACIÓN PROTEÍNA CORPORAL/GRASA CORPORAL	125
5.1.5	HÍGADO, CORAZÓN y COLON.....	128
5.1.6	COLESTEROL, TG, HDL, GLUCEMIA, ÍNDICE ATEROGÉNICO, IGF-1 Y LEPTINA	132
5.1.7	LIPOPEROXIDACIÓN HEPÁTICA (LPO) y MUERTE CELULAR HEPÁTICA.....	137
5.1.8	ACTIVIDAD PARAOXONASA (PON1) y RAZÓN PON1:HDL.....	139
5.2	TABLAS	143
5.3	GRÁFICOS.....	163
5.4.	IMÁGENES.....	193
6	DISCUSIÓN	205
7	CONCLUSIONES	247
8	ABREVIATURAS	251
9	BIBLIOGRAFÍA	255

1.1. RESUMEN

1.1.1. English Abstract

Title: Effects of exogenous treatment with rhGH on the lipid profile, paraoxonase activity and other corporal parameters of adult and old BALB/c mice fed two diets containing lactalbumin.

Abstract

Aging in animals is accompanied by the apparition of deleterious processes, not always exclusive of old age. In the search for strategies struggling aging and its unwanted effects, this study tested two strategies antiaging and their interactions: the exogenous treatment with recombinant human Growth Hormone (rhGH) on one hand, and the nutrition with a high quality protein source as lactalbumin on the other hand.

The objectives of this study were:

- 1) To apply two anti-aging strategies, namely: rhGH treatment and feeding two dietary lactalbumin levels (14% or 20%), to adult and old BALB/c mice to study its effects, as well as the age effect, on feed intake, corporal parameters, body composition, specially body protein, body fat and the relationship between them.

- 2) To study the effects of the two strategies and the age effect on the lipid profile and the paraoxonase (PON1) activity.
- 3) To Evaluate the possible effects of the factors studied (AGE, TREATMENT and DIET), as well as the interactions among the factors by means of the ANOVA analysis and *post hoc* multiple comparison analysis.
- 4) Controls were used at two levels: on the first level, controls were of two types depending on the factor considered i.e. rhGH vs. saline, and 20% diet vs. 14% diet. Whereas the second level of controls were used to compare the experimental lactalbumin diets vs. a maintenance commercial diet.
- 5) Finally, a histological study of the liver was performed to test the hepatocyte status among the different groups of mice.

Experimental Design

In the study, 72 male BALB/c mice (Charles River, Barcelona, Spain) were maintained under controlled conditions (Animalario Sección Departamental de Fisiología UCM, ES280790000085) until the required age was attained (6 or 18 months, n=36 adults, n=36 olds). The experimental period was 30 d and began after 7 d of previous adaptation to diet. Mice of each age group were assigned randomly to one of the three diets: control commercial (A04, Panlab, Barcelona, Spain), or one of the two experimental lactalbumin diets (14% or 20%). The groups within each age-groups were: CC (n=12), 14% (n=12) and 20% (n=12). Additionally, the treatments to mice were assigned randomly to be either rhGH (NovoNordisk S.A. Spain), (2 µg/g BW) or saline solution (20 µL/g BW), administered s.c. twice daily.

Results and conclusions

The influence of the factors AGE, TREATMENT and DIET on the studied parameters of experimental mice was variable but AGE and TREATMENT effects were greater than DIET effects. However, DIET effects also showed some influences as in the case of lipid profile and in the interactions with the other factors. The study of the body protein/body fat ratio was the best way to know the substrate utilization by the experimental mice.

Treatment of adult and old mice with rhGH increased their body weight, body gain, and lean body, by means of the increased dietary efficiency, conducting dietary substrates to body protein stores rather than fat stores.

The 14% lactalbumin diet seemed to supply an adequate amount of substrates as the body protein/fat ratio was more positive than those fed 20% lactalbumin diet, these last mice even appeared to suffer an excess of supply of substrates (both saline and rhGH treated).

Results suggested that lactalbumin diets increased atherogenic status in all experimental mice. However, these diets provoked only in saline adult mice marked alterations compatible with hepatic steatosis.

The PON1 activity that originally was described as an index of atherogenic risk and lipid oxidation resulted modified by the liver alteration mediated by the dietary lactalbumin intake in confluence with other circumstances.

Treatment with rhGH to adult mice of both diets seemed to revert the hepatic steatosis increasing the PON1 activity improving also their lipid profile.

1.1.2. Resumen en español

Título: EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE rhGH Y DE LA INGESTA DE DIETAS CON LACTOALBÚMINA SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO, LA ACTIVIDAD PARAOXONASA Y PARÁMETROS PONDERALES EN RATONES BALB/c ADULTOS Y VIEJOS

Resumen

El progreso de la edad lleva en los seres vivos al envejecimiento como un proceso ineludible y viene acompañado de una serie de alteraciones y procesos deletéreos que no son exclusivos de la vejez. En este estudio se seleccionaron dos estrategias antienvjecimiento: por un lado la estrategia endocrina consistente en la administración exógena de hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH), y por otro la estrategia nutricional que propone el suministro de una proteína de alta calidad nutricional como es la lactoalbúmina en dos concentraciones en la dieta.

Los objetivos de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

- 1) Aplicar dos estrategias antienvjecimiento: el tratamiento con rhGH y la alimentación con dietas conteniendo dos concentraciones de lactoalbúmina (14% y 20%) a ratones BALB/c maduros y viejos, para determinar sus efectos, así como la diferencia de edad, sobre los parámetros ponderales, la

ingesta, y la distribución de sustratos corporales, en especial la grasa y la proteína, así como la razón proteína/grasa.

- 2) Estudiar, los efectos de dichas estrategias y la edad, sobre el perfil lipídico y la actividad de la enzima paraoxonasa (PON1).
- 3) Evaluar los posibles efectos de los factores (EDAD, TRATAMIENTO y DIETA), así como de las interacciones de dichos factores (análisis de la varianza) y el estudio posterior de las diferencias de entre grupos (comparación *post hoc*).
- 4) Realizar estudios comparativos con controles a dos niveles. Por una parte, con controles del tratamiento endocrino y nutricional, comparando ratones tratados con rhGH frente a salinos, así como 20% frente a 14%; y en segundo lugar comparando los ratones alimentados con las dietas experimentales frente a controles alimentados con una dieta comercial control.
- 5) Se realizó un estudio histológico del parénquima hepático para poder comprobar y comparar el estado de los hepatocitos entre los diversos grupos experimentales y controles.

Diseño experimental

Se utilizaron 72 ratones BALB/c machos (Charles River, Barcelona, España) que se mantuvieron en condiciones controladas (Animalario de la Sección Departamental de Fisiología UCM, ES280790000085) hasta que los animales alcanzaron la edad experimental (6 ó 8 meses). El periodo experimental tuvo una duración de 30 días y comenzó después de un periodo de adaptación a la dieta (7 d). La dieta suministrada se determinó aleatoriamente entre la dieta control comercial (A04, Panlab,

Barcelona, España) y una de las dos dietas experimentales isoenergéticas, con 14% ó 20% lactoalbúmina. Los grupos dentro de cada grupo de edad fueron: CC (n=12), 14% (n=12) y 20% (n=12). Además se determinó aleatoriamente el tratamiento para administrar a cada uno de los ratones alimentados con las dietas de lactoalbúmina (dos veces al día, vía s.c), bien hormona de crecimiento recombinante humana (rhGH) (2 µg/g peso ratón) (NovoNordisk S.A. España) o solución salina isotónica (control salino) (20 µL/g peso ratón).

Resultados y conclusiones

La influencia de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA sobre los parámetros estudiados en los ratones experimentales fue variable pero la EDAD y el TRATAMIENTO fueron los factores más significativos, aunque la DIETA influyó sobre el perfil lipídico e interacciones con los otros factores. La razón proteína/grasa corporal fue el mejor indicador para conocer la utilización de sustratos por los ratones en estudio. El tratamiento con rhGH incrementó el peso corporal y la ganancia del peso, así como la masa magra de los ratones, adultos y viejos, a través del incremento de la eficacia alimentaria y el depósito proteico. La dieta del 14% de lactoalbúmina pareció suministrar un nivel de sustratos más adecuado que la dieta del 20% ya que el índice proteína/grasa fue más favorable, el 20% llevó a los ratones a que mostraran signos de un exceso de sustratos (tanto rhGH como salinos). En general, las dietas con lactoalbúmina se mostraron aterogénicas en los ratones experimentales. Dichas dietas provocaron, únicamente en los adultos sometidos a ambas dietas (14 y 20%) con lactoalbúmina, una serie de alteraciones compatibles

con la esteatosis hepática. Por el contrario, estas dietas no parecieron afectar a los ratones viejos en las mismas condiciones experimentales. La actividad sérica de PON1, que originariamente se propuso como índice de riesgo aterogénico y oxidación lipídica resultó modificada por la alteración hepática mediada por la ingesta de las dietas con lactoalbúmina en determinadas circunstancias. La administración exógena de rhGH a los ratones adultos alimentados con ambas dietas con lactoalbúmina pareció revertir la alteración hepática por una parte y por otra aumentó significativamente la actividad sérica de PON1, mejorando también el perfil lipídico.

1.1.3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ingesta diaria, ingesta total e ingesta proteica total en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 2. Peso inicial, peso final, ganancia de peso, eficacia alimentaria en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 3. Grasa corporal residual, grasa corporal, grasa abdominal, grasa gonadal y suma de depósitos grasos en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 4. Pesos de soleo, bíceps, cuádriceps, gastrocnemio y suma de pesos musculares en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 5. Peso corporal vacío, proteína corporal absoluta, proteína corporal porcentual y relación proteína/grasa corporal en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 6. Pesos de hígado, corazón y colon en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 7. Valores de colesterol total, triglicéridos, HDL e índice aterogénico en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 8. Valores de concentraciones hemáticas de glucosa, leptina, IGF-I, PON1 y PON1: HDL en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 9. Valores de lipoperoxidación y muerte celular hepática en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 10. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre la Ingesta diaria (g), ingesta total (g) e ingesta proteica (g) en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 11. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre peso final (g), ganancia de peso (g/d) y eficacia alimentaria (g/g) en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 12. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre composición grasa y depósitos grasos corporales en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 13. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre los pesos de los músculos en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 14. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre el peso corporal vacío, proteína (g), proteína (%) y razón proteína/grasa en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 15. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre el peso del hígado, corazón y colon en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 16. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre el colesterol total, triglicéridos, HDL e índice aterogénico en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 17. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre glucosa, leptina, IGF-1, PON1 y PON1: HDL en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Tabla 18. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre LPO y muerte celular y en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

1.1.4. ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c , adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) grasa corporal residual, b) grasa corporal porcentual, c) grasa abdominal, d) grasa gonadal, e) suma de depósitos grasos.

Gráfico 2: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c , adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) suma de músculos, b) peso corporal vacío, c) proteína corporal, d) proteína corporal porcentual, e) razón proteína/grasa.

Gráfico 3: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c , adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) peso hígado, b) peso corazón, c) peso colon.

Gráfico 4: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c , adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) colesterol, b) triglicéridos, c) HDL-colesterol, d) índice aterogénico.

Gráfico 5: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c , adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) glucosa, b) leptina, c) IGF-1.

Gráfico 6: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c , adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) PON 1, b) PON 1: HDL.

Gráfico 7. Relaciones lineales de ganancia de peso y la ingesta total con peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 8. Relación lineal de la eficacia alimentaria con el peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 9. Relación lineal entre la glucemia y la ingesta total, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 10. Relación lineal entre ganancia de peso y eficacia alimentaria, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 11. Relación lineal entre la grasa corporal residual y el peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 12. Relación lineal entre la grasa corporal residual y la glucemia, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) (a) y tratados con rhGH (b) y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 13. Relación lineal entre la suma de músculos y el peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 14. Relación lineal entre la proteína corporal y el peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 15. Relación lineal entre la razón proteína/grasa y la glucemia, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) (a) y tratados con rhGH (b) y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 16. Relación entre pesos de corazón y colon con el peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 17. Relación lineal entre peso del hígado y el peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 18. Relación lineal entre HDL y el peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 19. Relación lineal entre el valor de LPO y el peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 20. Relación lineal entre la muerte celular y PON1, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 21. Relación lineal entre el valor de LPO y el peso vacío, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

Gráfico 22. Relación lineal entre PON1 y la razón PON1: HDL, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ENVEJECIMIENTO

2.1.1 DEFINICIÓN DE ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso irreversible que afecta de forma heterogénea a las células de los seres vivos, las cuales, con el paso del tiempo, se ven sometidas a un deterioro morfológico y funcional que finalmente puede conducir las a la muerte (Warner, Hodes y col. 1997).

Para definir el envejecimiento existen múltiples propuestas debido a la gran variedad de procesos que se ven implicados en un fenómeno tan complejo.

Una forma de definir el envejecimiento, como proceso biológico, la constituyen las cuatro reglas expuestas por el gerontólogo americano Bernard Strehler (Strehler 1962) según las cuales, el envejecimiento sería un fenómeno:

- 1) Universal. La universalidad del envejecimiento se refiere a la incidencia de dicho proceso en todos los individuos de una especie. Todos los individuos envejecen, y lo mismo puede decirse de todas las especies animales multicelulares, especialmente de aquellas que, como la humana, dejan de crecer al alcanzar el desarrollo adulto.
- 2) Intrínseco. El carácter endógeno se refiere a que las causas del proceso están determinadas mayoritariamente por factores internos (en última instancia por los genes) y no por el ambiente. Dos hechos confirmarían esta circunstancia: el envejecimiento continúa aunque se proteja al individuo de toda fuente de daño procedente del exterior y la existencia de distintas longevidades máximas en diferentes especies que viven en el mismo ambiente.
- 3) Progresivo. Supone que las causas del proceso están presentes en los individuos a lo largo de toda su vida. De esta forma, los cambios que se observan con

la edad, como el deterioro de las capacidades fisiológicas (gasto cardíaco máximo, elasticidad muscular, capacidad vital...), se producen de forma progresiva.

4) Deletéreo. El envejecimiento tiene un marcado carácter perjudicial para el individuo. Los cambios asociados al envejecimiento se observan de manera más clara en células postmitóticas, como neuronas y cardiomiocitos (Miquel, Economos y col. 1980) que en las que se dividen continuamente, como los enterocitos intestinales.

Otra definición adecuada sería la que propone que el envejecimiento es la acumulación progresiva de cambios con el paso del tiempo que reducen la capacidad del individuo para enfrentarse al estrés disminuyendo así sus posibilidades de supervivencia (Harman 1992).

Hasta que el individuo llega a su madurez se va a originar una producción, mantenimiento y reparación de tejidos, adecuados, pero a partir de este momento, comenzaría una degradación endógena que va a conducir a una pérdida de funcionalidad y de supervivencia. Por lo tanto, otra definición del envejecimiento sería un conjunto de procesos que van a contribuir a incrementar la tasa de mortalidad específica para una población que vive en condiciones ideales para la supervivencia. Estos procesos tienen una importancia relativa en la naturaleza, ya que las causas extrínsecas de mortalidad son tan frecuentes que sólo un número muy pequeño de individuos sobreviven hasta alcanzar la longevidad máxima de su especie (Kirkwood 2005).

2.1.2. CARACTERÍSTICAS DEL ENVEJECIMIENTO

En el envejecimiento existirían cinco características comunes a nivel de organismo, tejido o células. Así, a partir de la madurez:

- 1) Aumentaría la mortalidad.
- 2) Cambiaría la composición bioquímica de los tejidos.
- 3) Deterioro de las capacidades fisiológicas como elasticidad muscular
- 4) Disminuiría la capacidad de adaptación a estímulos medioambientales.
- 5) Aumentaría la vulnerabilidad para enfermedades como procesos degenerativos nerviosos o musculares, alteraciones del sistema inmune o tumores debidos a una desregulación en la proliferación celular (Bruce y Troen 2003).

A nivel molecular, la capacidad metabólica, respuesta al estrés, desregulación y estabilidad genética, son importantes en el desarrollo del envejecimiento (Jazwinski 2000). Finalizado el desarrollo del ser vivo, la inestabilidad génica produciría una acumulación de errores que no podrían ser reparados y ocasionarían la muerte (Kale y Jazwinski 1996). Las modificaciones metabólicas pueden conducir al desarrollo de patologías como hipertensión, aterosclerosis e hipertrofia del ventrículo izquierdo y el riesgo de estas enfermedades aumenta con la edad, mientras que el ejercicio aeróbico contribuye a mantener la flexibilidad arterial y reduciría la presión arterial sistólica (Graham, Evans y col. 2008). Por el contrario, si además del avance de la edad existen situaciones fisiopatológicas concomitantes como síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares, el envejecimiento se acelera (Allard, Gosein y col. 2011).

El envejecimiento y el síndrome metabólico están asociados a un aumento de la lipoperoxidación (LPO) y generación de radicales libres de oxígeno (ROS). Como resultado se produciría un aumento de estrés oxidativo, alteraciones en

mitocondrias y lisosomas y una mayor prevalencia de enfermedades cardiovasculares. Estos orgánulos subcelulares tienen un papel muy importante en la muerte celular programada o apoptosis.

Las mitocondrias van a generar grandes cantidades de ROS y son muy vulnerables a los procesos de oxidación que se producen durante el envejecimiento. Las mitocondrias envejecidas se caracterizan por un deterioro en la integridad de su membrana debido a los lípidos de membrana oxidados, un aumento en la permeabilidad y una disminución en la actividad de enzimas que son proteínas integrantes de la membrana mitocondrial interna (Yu, Chen y *col.* 1996). El deterioro de la función mitocondrial se debe a la disminución de las tasas de transferencia de electrones, de los complejos I y IV, y de consumo de oxígeno. En los roedores viejos se observa un aumento de productos de oxidación de fosfolípidos, de proteínas y de DNA, y una disminución de potencial de membrana. Estos factores son determinantes para la apoptosis celular. Un indicador temprano de este tipo de muerte celular sería estrés oxidativo mitocondrial producido por las altas concentraciones de ROS que se asocia a daño celular. El nivel de estrés aumenta con la edad (Sastre, Pallardo y *col.* 2003).

2.1.3 TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

Existen un gran número de teorías para explicar la naturaleza del envejecimiento, muchas de las cuales coexisten porque no se contradicen entre ellas, o porque tratan de explicar formas independientes y diferentes de senescencia (Medveded 1990).

Por la naturaleza multicausal del envejecimiento, resulta improbable que una única teoría pueda explicar todos sus mecanismos. Así, existen teorías evolutivas, genéticas, celulares, moleculares y orgánicas (Semsei 2000).

El envejecimiento sería la consecuencia de una serie de factores, intrínsecos (genética) y extrínsecos (ambientales, estilo de vida y enfermedades asociadas), que interactúan sobre el organismo a lo largo del tiempo, y determinan, finalmente un debilitamiento de la homeostasis que culmina con la muerte. El programa genético empezaría a ejecutarse con el desarrollo, continuaría en el adulto y que culminaría, tras la etapa reproductiva, con la vejez (Finch 1990) El envejecimiento, por lo tanto, obedecería a un proceso endógeno y progresivo debido a más de una causa principal. Así, aunque los animales se mantengan en condiciones óptimas durante toda su vida, seguirán mostrando una velocidad de envejecimiento típicamente característica de su especie.

Una teoría del envejecimiento debería explicar cambios: perjudiciales (reducen las funciones), progresivos (que tengan lugar gradualmente), intrínsecos (que no sean por causa de agentes medio ambientales modificables), universales (todos los miembros de una especie deben revelar los déficit) (Strehler 1982).

Las numerosas teorías para explicar el envejecimiento se pueden dividir en dos grandes grupos: las que afirman que el proceso de envejecimiento sería el resultado de la suma de alteraciones que ocurren de forma aleatoria y se acumulan a lo largo del tiempo (*teorías estocásticas*) y las que suponen que el envejecimiento estaría predeterminado (*teorías no estocásticas o deterministas*).

Las *Teorías estocásticas*. De acuerdo con estas el envejecimiento se produce como producto de fenómenos aleatorios y postulan que se produce una acumulación fortuita de acontecimientos perjudiciales provocada por la exposición a factores exógenos externos. Dentro de este grupo están incluidas las teorías de los radicales libres, inflamatoria, inmunológica, de los productos de deshecho, de las uniones cruzadas, del error-catástrofe, de la mutación somática y las teorías genéticas (de regulación génica, de la diferenciación terminal y de la inestabilidad del genoma).

Las *Teorías no estocásticas o deterministas*. Bajo este concepto se engloban diferentes teorías que se describen mediante un número limitado de variables conocidas. Sugieren que los procesos del envejecimiento están programados dentro del genoma de cada organismo. En este grupo están incluidas, entre otras, la teoría de la capacidad replicativa finita, las teorías de programas o de desarrollo (de relojes biológicos, la hipótesis de los genes determinantes de la longevidad, de la inactivación de múltiples copias de DNA) y las teorías evolutivas (de Weissman, de acumulación del daño, de acumulación de mutaciones, antagonística pleiotrópica, del soma descartable o desgaste y del gen egoísta).

2.1.4. MANIFESTACIONES DE LA VEJEZ

2.1.4.1. Composición corporal

La composición corporal de cualquier animal sería el resultado de la influencia de la nutrición en un período de tiempo dado, sobre los factores genéticos y fisiológicos que conjuntamente determinan su fenotipo. Por lo tanto, a través de variaciones en la dieta se podría modificar la composición corporal de animales que comen *ad libitum*. Los animales tienen un crecimiento dado y van a modificar la ingesta a fin

de llegar a su máximo desarrollo, de la mejor forma posible (Webster 1972). Su velocidad de crecimiento y su composición corporal van a depender de la cantidad de nutrientes que consumen y de como lo hacen (Parks 1982).

El envejecimiento se asocia a cambios en la composición corporal, especialmente pérdida de componentes magro como se produce en la sarcopenia o pérdida de músculo esquelético y aumento de masa grasa (DiPietro, Katz y col. 1999). Además, se van a producir disminuciones de la actividad física, de hormonas como testosterona, hormona de crecimiento (Growth Hormone, GH) y estrógenos, y de excreción urinaria; así como de resistencia a la insulina (Sattler 2013). Muchos ancianos presentan un apetito reducido por lo que consumen dosis inferiores de proteínas, lo que produce un ritmo acelerado de sarcopenia, que puede ir unido a alteraciones cognitivas, disminución de la masa ósea, disfunción inmune, anemia o alteraciones musculares (Chapman 2004).

2.1.4.2. Perfil lipídico

El descenso en los niveles séricos de colesterol va a producir una disminución en la incidencia y en la prevalencia de muerte por cardiopatía isquémica y/o de enfermedades cardiovasculares, mientras que una concentración elevada de lipoproteínas de baja densidad (LDL) sería un factor de riesgo, y elevadas concentraciones séricas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) protegerían de enfermedades cardiovasculares (Asztalos, Lefevre y col. 2000). Por ello, preventivamente, se intentaría aumentar los valores plasmáticos de HDL para disminuir el riesgo de padecer esas enfermedades. También se han relacionado unos altos niveles de triglicéridos (TG) con el desarrollo de cardiopatías (Gugliucci y Menini 2015).

Las HDL tienen actividad antioxidante y serían capaces de inhibir la peroxidación de las LDL (Ng, Shih y col. 2005). También se encargan del transporte reverso del colesterol desde los macrófagos y células tisulares al hígado, donde será excretado directamente o convertido en ácidos biliares (Barter 2002). Además, las HDL inhiben las células endoteliales que favorecen la adhesión de monocitos y fibroblastos que forman la placa de ateroma. En el envejecimiento de los ratones se produciría aumento en los valores de colesterol y disminución de los niveles de HDL, por lo que se ve incrementado el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Las LDL oxidadas se acumulan y van a ser reconocidas por receptores que promueven la adhesión de monocitos y neutrófilos a la pared endotelial (Navab, Hama y col. 2001).

2.1.4.3. *Paraoxonasa 1 (PON1)*

La Paraoxonasa 1 (PON1) es una enzima, que forma parte de una familia de proteínas que también incluye PON 2 y PON 3 (Costa, Vitalone y col. 2005). El nombre se refiere a su capacidad para hidrolizar al Paraoxon (metabolito del insecticida denominado Paration) (Ng, Shih y col. 2005). Esta enzima se encuentra en una subfracción de las HDL. Su presencia también se ha detectado en las lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL) (Bergmeier, Siekmeier y col. 2004).

Más concretamente, PON1 es una glicoproteína esterasa calcio-dependiente formada por 354 aminoácidos y con peso molecular de aproximadamente 45 kDa (Hassett, Richter y col. 1991), que presenta tres actividades: paraoxonasa (hidroliza compuestos organofosforados que se utilizan como insecticidas), arilesterasa (hidroliza ésteres aromáticos) y lactonasa (hidroliza lactonas aromáticas y alifáticas). La actividad arilesterasa es la que presenta importancia fisiológica. Esta

enzima es sintetizada por el hígado y, una vez en el plasma, se asocia a HDL (Costa, Giordano *y col.* 2011) y, en menor proporción, a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y a los quilomicrones (Deakin, Moren *y col.* 2005). Un pequeño porcentaje quedaría en forma libre (Fuhrman, Volkova *y col.* 2005). Una de las propiedades de PON1 es la protección de HDL y LDL frente a la oxidación. El grado de oxidación de las LDL se relacionaría inversamente con la actividad arilesterasa (Costa, Cole *y col.* 2003). Esta acción es fundamental para la prevención del desarrollo de enfermedades cardiovasculares y de aterosclerosis (Aviram y Vaya 2013). Es necesario un equilibrio entre la forma enzimática unida a las lipoproteínas y la forma libre. Un aumento de esta última, se relacionaría con elevados niveles de estrés oxidativo (Rosenblat, Elias *y col.* 2013). Otras de las propiedades de PON1 serían la capacidad de inhibición de las moléculas de adhesión (Mackness y Mackness 2004), de la formación de células espumosas y de la biosíntesis de colesterol por macrófagos, y la capacidad activadora del transporte inverso del colesterol (Rosenblat, Vaya *y col.* 2005).

Los niveles plasmáticos de esta enzima varían con la edad, siendo muy bajos en el nacimiento para ir aumentando gradualmente durante los dos primeros años de vida humanos. Luego permanece estable y disminuye en el envejecimiento. En los ancianos este descenso se encuentra asociado al aumento del estrés oxidativo (Costa, Vitalone *y col.* 2005).

Existen medicamentos que aumentan la expresión y la actividad de PON1 en animales y humanos. Se han estudiado fármacos cardiovasculares (Estatinas, Fibratos, Ácido Acetil salicílico) y fármacos antidiabéticos (Sulfonilureas,

Rosiglitazona). Se debe valorar la relación riesgo/ beneficio, ya que, como cualquier fármaco, su uso crónico produciría efectos adversos (Costa, Giordano *y col.* 2011). También existe la posibilidad de administración exógena de PON1 recombinante humana (Stevens, Suzuki *y col.* 2008).

Como PON1 se inactiva con agentes oxidantes endógenos o exógenos (Nguyen y Sok 2003), una estrategia importante y más segura para la salud, sería la administración de una dieta antioxidante para aumentar los valores enzimáticos (Costa, Giordano *y col.* 2011). Para ello, se podría incrementar la ingesta de vitaminas C y E (Kunes, Cordero-Koning *y col.* 2009), suplementación con Resveratrol (Costa, Giordano *y col.* 2011) o Taurina (Dirican, Tas *y col.* 2007).

Se pueden encontrar alteraciones en los niveles de PON1 plasmáticos en enfermedades cardiovasculares, diabetes, Alzheimer, enfermedades crónicas renales y hepáticas (Camps, Marsillach *y col.* 2009). Así, pacientes con enfermedad coronaria, con hipercolesterolemia familiar (Tomas, Senti *y col.* 2000), en diabéticos tipo 1 y 2 (Mackness, Durrington *y col.* 2002), en artritis reumatoide (Tanimoto, Kumon *y col.* 2003) y en demencias (Paragh, Balla *y col.* 2002), los niveles de PON1 se encuentran disminuidos. En diabéticos, además, la forma libre de PON1 se encuentra incrementada (Gaidukov, Rosenblat *y col.* 2006).

La actividad de PON 1 también se encuentra disminuida en fumadores y en dietas ricas en grasas (Costa, Vitalone *y col.* 2005). También la disminución en la expresión de PON1 se relacionaría con un aumento del estado aterogénico (Rozenberg, Shih *y col.* 2003), con un incremento de enfermedades cardiovasculares (Gugliucci y Menini 2015), con cirrosis y hepatitis crónica (Ferre, Camps *y col.* 2002). Por lo

tanto, PON 1 se podría utilizar como marcador de riesgo cardiovascular y hepático, e indicador de riesgo de padecer aterosclerosis (Costa, Vitalone y col. 2005).

2.1.4.4. Estado oxidativo y lipoperoxidación

La mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a que la utilización del oxígeno por las células da lugar a la generación de radicales libres. Estos radicales se caracterizan por la presencia de electrones individuales, no apareados, en los orbitales más externos de su estructura atómica (Riley 1994). Con esta configuración se adquiere la capacidad de reaccionar, de forma muy rápida, con diversas biomoléculas (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos) a las que oxidan, al secuestrar de éstas un electrón, lo que produce cambios estructurales y/o funcionales importantes que encuentran su repercusión a nivel celular, tisular y orgánico. La mayor parte de los radicales que producen daño en los sistemas biológicos son radicales libres de oxígeno, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species). Su origen puede ser interno y externo. Los agentes endógenos son: mitocondria (por la cadena respiratoria), metabolismo de citocromo P450, peroxisomas y células activadoras de la inflamación (Inoue, Sato y col. 2003). Los generadores exógenos de ROS son: xenobióticos, metales (redox o no), iones y radiaciones (Valko, Rhodes y col. 2006). Así, existe la *Teoría de radicales libres* que intenta explicar el envejecimiento (Harman 1956). Según esta teoría, los radicales libres producidos durante la respiración aerobia causan un daño oxidativo que se acumula y como resultado produce una pérdida gradual de los mecanismos homeostáticos, que se traduce en una disminución de la capacidad funcional de la célula, lo que conduce al envejecimiento y la muerte (Medveded 1990). En ese momento se conocía

relativamente poco sobre los sitios celulares de generación de los radicales libres y su interacción a nivel molecular. Teniendo en cuenta los avances que se han producido en ese campo, la hipótesis original de los radicales libres en el envejecimiento se ha ido modificando. Así, se incluye una relación entre la generación de oxidantes, la protección antioxidante y la reparación del daño oxidativo. La expectativa de vida puede ser aumentada al disminuir el grado de los fenómenos oxidantes (Balaban, Nemoto y *col.* 2005) y por aumento de antioxidantes (Beckman y Ames 1998). Estudios realizados en insectos, hongos y células de cultivo, apoyan el papel de la generación de ROS mitocondrial en el control de envejecimiento (Stroikin, Dalen y *col.* 2005).

Beckman y Ames publicaron una importante revisión en la que plantean una división de las hipótesis en versiones “fuertes” y “débiles” La versión “fuerte” de la teoría plantea que el daño oxidativo determina la esperanza de vida y que, por tanto, un mayor daño acortará la esperanza de vida; mientras que la versión “débil” postula que el daño oxidativo está asociado con enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Por supuesto, existe una continuidad entre estas dos hipótesis extremas. La versión débil parece estar bien arraigada en los múltiples estudios que demuestran una asociación entre el elevado daño oxidativo con el envejecimiento y las enfermedades degenerativas (Beckman y Ames 1998).

La mitocondria es el sitio más importante de generación de ROS (Barja, Cadenas y *col.* 1994). En la cadena respiratoria mitocondrial, las peculiaridades de las reacciones redox, hacen que los radicales libres se transfieran de uno en uno, siendo ésta la principal razón por la que se producen fugas en la cadena. Se puede producir

daño tanto a la membrana interna de la mitocondria como a los componentes de transporte de electrones o al DNA mitocondrial, lo que incrementa más la producción de ROS y, consecuentemente, más el daño a la mitocondria y aumenta el estrés oxidativo por aumentar la producción de oxidantes (Muller, Liu y col. 2004).

La tasa de generación de ROS mitocondrial es menor en los animales longevos que en los de vida corta. Esto se da en todos los vertebrados homeotermos longevos, independientemente del valor de su consumo de oxígeno por unidad de peso corporal (que es menor en animales de gran tamaño corporal que en los de pequeño tamaño) y explica por qué los antioxidantes se correlacionan negativamente con el potencial de vida máximo (los animales longevos tienen menores valores de antioxidantes porque su tasa de generación de ROS es baja) (Barja 2004). Los estudios realizados en aves (animales homeotermos excepcionalmente longevos) son especialmente ilustrativos ya que, al igual que ocurre en el caso de murciélagos y primates, viven mucho más tiempo que los mamíferos en general de peso corporal o tasa metabólica similar. A pesar de sus altas tasas de consumo de oxígeno, las tres especies de aves estudiadas, pertenecientes a diferentes familias (periquitos, canarios y palomas, con potencial de vida máximo de 21, 24 y 35 años, respectivamente) muestran tasas menores de generación de ROS mitocondrial que ratones y ratas (con potencial de vida máximo de 3 y 4 años). En muchos casos es posible porque el porcentaje de flujo electrónico total en la cadena respiratoria dirigido a la producción de ROS, es decir, el porcentaje de fuga de radicales libres, es menor en el caso de las aves. Su cadena respiratoria transporta los electrones de forma más eficiente en lo que se refiere a evitar la fuga univalente hacia el oxígeno (St Pierre, Buckingham y col. 2002).

La generación de ROS es más importante conforme la tasa metabólica se eleva, ya que existe un mayor consumo de oxígeno. De hecho, las especies más longevas, como el hombre, tienen una tasa metabólica más baja y muestran más elevadas sus defensas antioxidantes que especies menos longevas, como ratón, mosca de la fruta o el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Rose 1999). También se han descrito tasas menores de generación de ROS mitocondrial en cerebro humano comparado con el de rata (Kudin, Bimpong-Buta y col. 2004). Por otra parte, en la mayoría de los estudios comparados realizados, la diferencia en producción de ROS mitocondrial entre especies suele ser menor que la diferencia de potencial máximo de vida (Barja y Herrero 1998). Esto estaría de acuerdo con la idea, ampliamente extendida, de que existe más de un factor principal causante del envejecimiento (Bruce y Troen 2003).

Los radicales libres son importantes en la regulación de genes, en la replicación y diferenciación celular, y en la apoptosis (Sen y Packer 1996). Los radicales libres de oxígeno estarían relacionados con la regulación de la muerte celular. La superproducción de ROS precede a las características típicas de la muerte celular como alteraciones mitocondriales o condensación de cromatina. Estos datos junto con la protección frente a la muerte por diferentes agentes antioxidantes muestran la importancia de estas moléculas (Suzuki, Forman y col. 1997).

El término apoptosis fue utilizado por primera vez en 1972, para indicar una nueva forma de muerte celular. En este caso las células morían de una manera morfológicamente distinta a la muerte por necrosis, ya que se producían una serie de cambios secuenciales que no tenían como resultado la pérdida de la integridad de la membrana celular y que además no desencadenaban una respuesta

inflamatoria, tal y como ocurría en la muerte por necrosis. Estos investigadores propusieron la clasificación de los procesos de muerte en dos amplias categorías. El término de necrosis, que por entonces englobaba todas las formas de muerte, pasó a denominar un tipo muerte rápida y violenta observada tras una alteración ambiental severa. En contraposición, aparecía el término apoptosis, que englobaba un proceso de muerte más controlado que desempeñaría una función complementaria a la mitosis en la regulación de las poblaciones celulares (Kerr, Wyllie y *col.* 1972). Más tarde, otros embriólogos describieron estos mismos cambios como muerte celular programada (PCD) (Clarke y Clarke 1996). Lo cierto es que puede haber tantas formas de morir activa o de forma programada como tipos celulares hay. Por esta razón, actualmente muchos autores prefieren utilizar el término PCD en vez de apoptosis, siempre que los componentes de la célula participen de una forma activa en su muerte, sin necesidad de que se produzcan todos los cambios morfológicos descritos en la apoptosis. La característica más sobresaliente de la apoptosis es que se trata de un mecanismo fisiológico de muerte celular que es necesario para mantener la plasticidad del organismo y eliminar las células inservibles o que se tornan peligrosas (Kroemer, Galluzzi y *col.* 2009).

El estrés oxidativo produce un daño en moléculas mitocondriales como DNA, hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Los productos se acumulan en pequeñas proporciones, pero son de gran importancia cualitativa por la gran dificultad para reparar el daño. Las especies derivadas de oxígeno pueden reaccionar con macromoléculas de forma perpetua (Sohal y Weindruch 1996). Las células diferenciadas, postmitóticas, contienen mitocondrias que utilizan grandes cantidades de oxígeno. Tejidos postmitóticos como el cerebro sufren más daño

oxidativo y se ven más afectados con la edad. Se han visto cambios en la función y morfología mitocondrial asociados al envejecimiento.(Sastre, Pallardo y *col.* 2003). Las primeras investigaciones sobre la destrucción de moléculas biológicas por los radicales libres se centraron en los lípidos (Gutteridge y Halliwell 1990). Los radicales libres conducen a la degradación oxidativa de los lípidos de la membrana celular. Esto da lugar a la formación de gran número de productos de degradación (hidroperóxidos, aldehídos, cetonas...). La primera consecuencia de este proceso es la profunda alteración de las propiedades fisicoquímicas de las membranas y de la funcionalidad de los enzimas allí ubicados. Se producen cambios en la permeabilidad y fluidez de las membranas celulares. Las membranas mitocondriales son especialmente vulnerables (Ross 1989).

La acción de los radicales libres sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácido grasos poliinsaturados (Cross, Halliwell y *col.* 1987), lo que provoca su peroxidación que conduce a pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, y a la ruptura de los gradientes iónicos de membrana. La reacción de peroxidación puede iniciarla el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) al extraer un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de la cadena del ácido graso y dejar un electrón desapareado, con lo que se genera un radical lipídico. Este radical rápidamente sufre un reordenamiento molecular para producir un dieno conjugado, que reacciona con el oxígeno molecular y produce un radical hidroperoxil. Este radical puede a su vez extraer un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado para formar un nuevo radical lipídico. Este radical se combina con otra molécula de oxígeno y continúa la reacción en cadena. El hidroperóxido lipídico es un componente estable hasta que se pone en contacto con iones metálicos de

transición, entonces se producen más radicales, que a su vez inician y propagan otra cadena de reacciones. Los productos finales de este proceso son aldehídos, gases hidrocarbonatos y varios residuos químicos, incluido el malondialdehído (MDA) que es el marcador más ampliamente utilizado. Estos productos de degradación pueden difundir lejos del sitio de las reacciones y producir edema celular, además de influir sobre la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Asimismo, puede alterar la actividad de fosfolipasas e inducir la liberación del ácido araquidónico, con la subsiguiente formación de prostaglandinas y endoperóxidos (Holgado, Deluis y *col.* 1994). El malondialdehído, a su vez, puede reaccionar con lípidos y proteínas para formar bases de shiff conjugadas, productos fluorescentes insolubles que se acumulan en el interior de los lisosomas y forman el pigmento de envejecimiento conocido con el nombre de lipofucsina que se acumula en los tejidos con la edad (Terman y Brunk 1998).

La composición de los ácidos grasos de las membranas celulares determina un papel muy importante en la peroxidación lipídica y puede intervenir en la determinación de la longevidad máxima. Así, un menor grado de insaturación de los ácidos grasos en las membranas, particularmente en la membrana mitocondrial interna, podría ser ventajoso y traducirse en una disminución en la sensibilidad a la peroxidación lipídica (Pamplona y Barja 2007). De acuerdo con esto, se ha comprobado que los animales longevos (aves y mamíferos) tienen un menor grado de instauración de los ácidos grasos (menor índice de dobles enlaces, DBI, e índice de peroxidizabilidad, PI) que los de vida corta (Hulbert, Pamplona y *col.* 2007). También se ha podido constatar que las aves, que son mucho más longevas que los mamíferos, también tienen un menor DBI que los mamíferos de igual tamaño corporal y tasa metabólica

(Pamplona, Portero-Otin y col. 1999); al estudiar la intensidad de la peroxidación lipídica en estas especies se observó que el bajo DBI de distintos órganos de los animales longevos actúa protegiendo a sus tejidos frente a la peroxidación lipídica de forma constitutiva, tanto si sus tasas metabólicas son bajas (en el caso de mamíferos de gran tamaño corporal) o altas (en el caso de las aves) (Pamplona y Barja 2007).

2.2. ESTRATEGIAS ANTIVENAJECIMIENTO

Existen diferentes propuestas antivenajecimiento, la mayoría van acompañadas de estudios que demuestran un aumento de longevidad en organismos simples y roedores, prevención de enfermedades relacionadas con la edad y seguridad en el uso crónico en pequeños mamíferos y primates. Algunas de las estrategias que se están estudiando actualmente son: (Longo, Antebi y col. 2015)

. Inhibición farmacológica del eje somatotrópico (GH/IGF-I): la disminución de los niveles plasmáticos de IGF-I (Insulin-like growth factor-1) produce un aumento en la longevidad. Terapéuticamente se puede actuar directa o indirectamente sobre las células o tejidos que producen o responden a GH y/o IGF-I. Existen fármacos que inhiben este eje y que han sido aprobados en el tratamiento de pacientes con acromegalia. Los análogos de somatostatina van a disminuir los niveles de GH en plasma por inhibición de la secreción de GH, pero a la vez van a disminuir la secreción de hormonas como insulina y producen efectos secundarios en un 20-50% de pacientes, por lo que no se van a poder utilizar de forma crónica para aumentar

la longevidad. En el tratamiento de pacientes con acromegalia también se usan antagonistas de receptor de GH, como Pegvisomant, que va a inhibir la acción de GH y bloquear la acción diabetogénica, por lo que podría ser utilizado para aumentar la longevidad (Longo, Antebi *y col.* 2015)

. Ayuno y restricción energética: la forma más extrema de restricción energética es la completa eliminación de nutrientes, de forma prolongada (dos o tres días seguidos bebiendo solamente agua) o intermitente. Se desconocen los efectos que pueden ocasionar estos ciclos a la salud (Trepanowski, Canale *y col.* 2011).

La restricción energética procedente de la disminución del consumo de proteínas contribuye a aumentar la longevidad (Mirzaei, Suarez *y col.* 2014). En particular, se han estudiado las restricciones de aminoácidos como Metionina y Triptófano (Spindler 2010).

. Inhibición farmacológica de mTOR. Se ha estudiado que la Rapamicina aumenta la longevidad en ratones (Miller, Harrison *y col.* 2014).

. Activación de sirtuinas. Las sirtuinas aumentan la longevidad en diferentes especies. El activador natural más potente que se ha identificado es el Resveratrol. Actualmente no existe un consenso entre la activación de estas moléculas y la disminución del envejecimiento (Couzin-Frankel 2011).

. Inhibición de la inflamación. En ratones se ha demostrado que diferentes fármacos anti-inflamatorios aumentan la longevidad, aunque este efecto es poco marcado (Longo, Antebi *y col.* 2015).

. Inhibición de la glicolisis. Con el envejecimiento aumentan las demandas energéticas. Por ello, la suplementación con glucosa y el mantenimiento del peso corporal van a aumentar la longevidad (Missios, Zhou y *col.* 2014).

. Uso crónico de fármacos como Estatinas, Metformina, inhibidores del enzima convertidor de angiotensina y Glucosamina (Longo, Antebi y *col.* 2015).

. Regulación de niveles hormonales hasta alcanzar a los de los adultos. En el envejecimiento se producen disminuciones hormonales de GH, IGF-I, melatonina, hormonas tiroideas, calcitonina, aldosterona, estrógeno y testosterona. El aumento de los niveles con terapias hormonales contribuye a aumentar la longevidad y a reducir el riesgo de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Vitetta y Anton 2007).

. Suplementación con antioxidantes como melatonina, vitamina E y C, cinc y selenio. Se necesitan más estudios sobre eficacia y seguridad a largo plazo (Fusco, Colloca y *col.* 2007).

Numerosos estudios experimentales en invertebrados y roedores han demostrado que la restricción en la dieta y las intervenciones a nivel del eje somatotrópico van a aumentar la longevidad entre 30-50%. Además van a disminuir la prevalencia de numerosas enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Longo, Antebi y *col.* 2015).

2.2.1. HORMONA DE CRECIMIENTO COMO ESTRATEGIA ANTIVENEJECIMIENTO

2.2.1.1. Características de la hormona de crecimiento

La hormona de crecimiento, también llamada somatotropina u hormona somatotropa, es una mezcla de péptidos. El péptido más importante desde un punto de vista fisiológico está formado por 191 aminoácidos y no presenta carbohidratos unidos a la cadena. En su estructura cristalina se observa que está formada por 4 alfa-hélices de 21 a 30 aminoácidos. Posee dos puentes disulfuro que unen las cisteínas que ocupan los lugares 53-164 y 181-189 (Kopchick y Andry 2000).

La GH es sintetizada, segregada y almacenada por las células somatotropas y somatomamotropas de la hipófisis anterior, en respuesta al factor liberador de GH producido por el hipotálamo. Es la hormona adenohipofisaria más abundante. En condiciones normales la hipófisis humana contiene entre 5-10 mg de GH, lo que supone un 10% del peso de la glándula (Leung y Ho 2001).

La secreción de GH depende de diversos factores. Sin embargo, la vía final común de la mayoría de los estimuladores de la GH es el aumento de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH, del inglés Growth Hormone-releasing hormone), la disminución de la somatostatina (SS) o ambos. Por el contrario, las sustancias que suprimen la GH disminuyen la GHRH, aumentan la somatostatina o actúan sobre ambos mecanismos. Algunos agentes pueden modificar la secreción de GH mediante la acción directa sobre las células somatotropas. Por lo tanto, la somatostatina, es un péptido hipotalámico inhibidor de la liberación de GH por bloqueo no competitivo de la estimulación por GHRH. También disminuye la frecuencia y amplitud de los pulsos de la GH (Baumann, Shaw y col. 1994).

La liberación de estas neurohormonas a la circulación portal hipotálamo-hipofisaria ocurre de forma rítmica y alternante, lo que conduce a una secreción de GH en forma de pulsos (originados por un aumento de la liberación de GHRH y una disminución de la liberación de SS), con aproximadamente 10 pulsos de secreción que duran unos 90 minutos y se producen cada 128 minutos, siendo más frecuentes por la noche, coincidiendo con el sueño profundo, con la presencia de las ondas lentas (fases III y IV del sueño). Por el contrario, el sueño ligero, asociado a movimientos oculares rápidos (sueño REM), inhibe la liberación de GH (Van Cauter, Leproult *y col.* 2000). Los niveles plasmáticos medidos en situaciones basales y en adultos sanos son habitualmente indetectables durante la mayor parte del día, siendo los niveles basales nocturnos de $1 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ y los diurnos de $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$. Los niveles de GH durante un pulso secretorio son habitualmente de $4,3 \pm 0,7 \mu\text{g/L}$ durante la noche y $2,7 \pm 0,5 \mu\text{g/L}$ durante el día aunque puede alcanzar niveles de hasta $40 \mu\text{g/L}$ durante un pulso secretorio (Toogood, Nass *y col.* 1997). La secreción en el hombre suele ser más pulsátil y en la mujer más continúa, además existen diferencias detectables en la amplitud de los pulsos (Meinhardt y Ho 2007). En el hombre la secreción es nocturna y en roedores machos la secreción ocurre en intervalos de 3-4 h. (Shapiro, Agrawal *y col.* 1995). La edad también influye en la secreción, siendo los niveles muy elevados al final de la vida fetal, posteriormente decrecen y permanecen bajos durante la infancia. En la pubertad la secreción es máxima y luego disminuye en la adolescencia tardía. Los valores permanecen constantes hasta los 30 años, luego disminuyen de forma progresiva. Esta disminución también se observa en los animales de experimentación. En ambos casos, la disminución está directamente

relacionada con las alteraciones que se observan en el envejecimiento (Azcoitia, Perez-Martin y *col.* 2005)..

La malnutrición crónica y el ayuno prolongado se asocian a un aumento en la amplitud y frecuencia de los pulsos de GH. La hipoglucemia estimula la secreción de GH, sin embargo, la hiperglucemia crónica en una diabetes mal controlada también se asocia con unos niveles aumentados de GH (Ho, Veldhuis y *col.* 1988). Las comidas ricas en proteínas y la administración de aminoácidos aislados, como arginina y leucina, estimulan la secreción de GH. Los péptidos opioides al igual que otros, como galanina y leptina, también estimularían la secreción de GH. Los niveles fisiológicos de leptina circulante parecen ejercer un efecto máximo en la secreción de GH y, solo la administración crónica de leptina para sostener un estado de hiperleptinemia es capaz de incrementar la secreción de GH (Ariznavarreta, Castillo y *col.* 2003).

La privación emocional se asocia a la supresión de la secreción de GH y en la depresión endógena se observa una disminución de las respuestas de GH a los estímulos de provocación (Sachar, Mushrush y *col.* 1972). El aumento de los niveles séricos de ácidos grasos libres produce una disminución de la GH basal así como la respuesta de GH ante estímulos como ejercicio físico, arginina, sueño, hipoglucemia insulínica y GHRH. En la obesidad se encuentra disminuida la secreción de GH basal como en respuesta a estímulos hipotalámicos e hipofisarios. La hiperglucemia inhibe la secreción de GH (Imaki, Shibasaki y *col.* 1986).

La secreción de GH también está influida por el sistema endocrino. Así, las hormonas tiroideas modulan la expresión del gen de GH, por eso los pacientes hipotiroideos van a presentar asociado un defecto en el crecimiento (Lima, Arce y *col.* 1993).

La GH se transporta en el suero ligada a proteínas denominadas GHBP (growth hormone binding protein). Su vida media es de 20-25 minutos y se metaboliza fundamentalmente en el hígado y en menor grado en el riñón. La eliminación es renal (Leung, Spencer *y col.* 1987).

Las proteínas de transporte van a amortiguar las oscilaciones agudas de los niveles séricos de GH asociadas con la secreción hipofisaria pulsátil de GH, prolongando su vida media de 7 a 29 minutos, y también van a disminuir el aclaramiento renal al formar el complejo GH/GHBP de alto peso molecular (Baumann, Shaw *y col.* 1989).

La GH se une con alta afinidad al receptor de GH (GHR), presente en la membrana celular de los tejidos diana de la hormona, donde ejercerá sus efectos somatogénicos y metabólicos (Edens y Talamantes 1998). En humanos, el hígado es el órgano más rico en estos receptores y, también, es el que contribuye en mayor grado a la GHBP circulante en el plasma. Las mutaciones en el gen receptor de la GH se asocian con inestabilidad completa o parcial a GH y talla baja (Hocquette, Postel-Vinay *y col.* 1990). La unión con el receptor activa a nivel intracelular una cascada de fosforilación en la que participa la vía JAK/STAT (signal transducing activators of transcription). Su acción predominante es estimular la síntesis y secreción hepática de IGF-I (Waters, Hoang *y col.* 2006).

GH puede actuar directamente sobre el crecimiento en animales GH-deficientes, pero la mayoría de sus acciones fisiológicas las ejerce a través de IGF-I. Este factor de crecimiento, con una estructura similar a la proinsulina, está formado por una cadena de 70 aminoácidos, se sintetiza fundamentalmente en el hígado y depende de los niveles circulantes de GH. Actúa localmente regulando el crecimiento y la

diferenciación celular, además va a inhibir la secreción de GH. El IGF-I circula, en su mayor parte, unido a proteínas transportadoras, denominadas IGFBP (Allard y Duan 2011). Destacando IGFBP-3 por ser el transportador más importante de IGF-I. IGFBP 1 inhibe la acción de IGF-I, ya que modula la fracción libre que es la metabólicamente activa. Los niveles de IGFBP 1 se relacionan negativamente con los niveles de insulina, tanto en diabéticos como en sanos. La administración intravenosa induce hipoglucemia y aumento de la captación de glucosa e incorporación a glucógeno en ratas normales e hipofisectomizadas (Zapf y Froesch 1986).

El receptor de IGF se encuentra en la superficie de las células y es semejante al receptor de la insulina en estructura y secuencia de aminoácidos. Esta similitud hace que exista una interacción entre ambas hormonas (Hughes y Friesen 1985).

El IGF-I posee propiedades anabólicas, antioxidantes, citoprotectoras y antiinflamatorias (Puche y Castilla-Cortazar 2012). Va a aumentar el metabolismo y la proliferación celular, mejora la función de numerosos tejidos y participa en la homeostasis de la glucosa. Los efectos de IGF-I dependen del estado nutricional, puesto que su administración en ratas desnutridas antes del destete no estimularía el crecimiento (Philipps, Persson y *col.* 1988). Un desequilibrio en los niveles de IGF-I puede producir alteraciones en la longevidad (Berryman, Christiansen y *col.* 2008). La tasa plasmática es edad-dependiente, siendo baja antes del nacimiento (cuando el crecimiento es independiente de la GH, solo el IGF-I es la responsable del crecimiento), luego aumenta durante la primera infancia para alcanzar los niveles máximos durante la pubertad, declinando después en adultos (Hall, Enberg y *col.* 1980).

La GH y el IGF-I desempeñan papeles esenciales en el crecimiento durante la infancia y sobre el metabolismo en la etapa adulta. El crecimiento no solo depende de GH, la presencia de IGF-I también influye. Ciertos experimentos realizados en ratas incapaces de producir IGF-I muestran que nacen con retrasos en el crecimiento de un 35% y para alcanzar la pubertad. Al inyectar GH no se observa crecimiento porque carecen de IGF-I (Liu y LeRoith 1999). La deficiencia de GH conduce a bajos niveles de IGF-I, mientras que la administración exógena de GH conduce a una elevación de sus niveles en sangre (Juul, Dalgaard *y col.* 1995).

Las actividades de GH e IGF-I en relación al crecimiento son diferentes (van Buul-Offers, Hoogerbrugge *y col.* 1988). El riñón, bazo y timo de ratas hipofisectomizadas son más sensibles al IGF-I, mientras que el músculo esquelético es más sensible a los efectos de la GH (Guler, Zapf *y col.* 1988) .

Tanto GH como IGF-I están involucrados en los mecanismos fisiológicos que se ponen en marcha frente a los procesos oxidativos, incluyendo la peroxidación lipídica. Ambas hormonas poseen cierta capacidad para prevenir el daño oxidativo inducido por el exceso de hierro en los tejidos más sensibles (intestino delgado y cerebro), pero pueden contribuir a un desequilibrio oxidativo en otros tejidos (Karbownik-Lewinska, Kokoszko *y col.* 2008). Todo incremento de las defensas antioxidantes en invertebrados y vertebrados, como los ratones, redundará en un paralelo incremento de la esperanza de vida (Bartke 2002). Además, las mutaciones espontáneas o inducidas experimentalmente a ratones, que interfieren con la síntesis o acciones de la GH, o sensibilidad a IGF-I, producen aumento en la longevidad. La esperanza de vida puede aumentar entre un 20 y un 70%,

dependiendo de factores como defecto endocrino, sexo, dieta y antecedentes genéticos. Este aumento se debe a mecanismos como disminución de niveles de insulina, mayor sensibilidad a la insulina, alteraciones en los metabolismos de hidratos de carbono y lípidos, reducción de la generación de ROS, mayor resistencia al estrés oxidativo y retraso en la aparición de las enfermedades relacionadas con la edad (Bartke 2005).

Para aumentar la longevidad se podría actuar disminuyendo la actividad del eje GH/IGF-I. Un rasgo común en los modelos animales más longevos es la disminución de la actividad de IGF-I. El envejecimiento en humanos sanos se asocia a disminución en las concentraciones de GH e IGF-I (Veldhuis, Erickson *y col.* 2005). El hecho de que la acción de una hormona pueda ser perjudicial, se podría explicar porque la evolución se centra en el éxito reproductivo en lugar de la longevidad (Bartke 2011). Las especies de vida corta requieren una maduración temprana y rápidamente alcanzar la capacidad reproductiva, solo así aseguran la supervivencia de la especie, esto sería independiente de la susceptibilidad a enfermedades durante el envejecimiento (Bartke 2011). La asociación negativa entre tamaño corporal y longevidad además de aplicarse a ratones se puede observar en otras especies como ratas, perros, caballos y, probablemente, seres humanos (Yuan, Tsaih *y col.* 2009). Aunque la relación entre la altura humana y longevidad sigue siendo controvertida, sobre todo en personas muy longevas. Las terapias que bloquean la señalización de IGF pueden suponer un beneficio clínico en pacientes con carcinoma o sarcoma (Maki 2010) y una disminución de mortalidad por cáncer en personas de edad avanzada (Major, Laughlin *y col.* 2010).

En la longevidad también sería importante la vía de señalización de insulina/GH/IGF-I. Las moléculas relacionadas podrían ser puntos de intervención para retrasar la evolución de las enfermedades relacionadas con la edad (Chiba, Yamaza y col. 2007).

La deficiencia de IGF-I produce el síndrome de Laron en los niños y cirrosis hepática en los adultos. Además, está relacionada con el envejecimiento, enfermedades neurológicas y cardiovasculares (Puche y Castilla-Cortazar 2012). En pacientes adultos con cirrosis hepática, el eje GH-IGF-I está gravemente alterado, causado por un estado de resistencia a GH en las células hepáticas (Picardi, D'Avola y col. 2006).

Las acciones de IGF-I serían distintas dependiendo de la duración del estímulo. Así, las acciones agudas producen efectos semejantes a los de la insulina, mientras que las crónicas incluyen síntesis de DNA y proliferación celular. Ese último caso ocurre en el crecimiento óseo y en el aumento de la oxidación lipídica (Oliveira, Salvatori y col. 2012).

2.2.1.2. Acciones de la hormona de crecimiento

A diferencia de otras hormonas, la GH no tiene un órgano diana único sino que se ha podido comprobar que ejerce sus acciones sobre multitud de órganos. Así puede actuar directamente sobre el tejido muscular, adiposo o hepático, en el control del metabolismo, o indirectamente al promover la secreción de somatomedinas IGF-I (estimula, entre otras funciones, la mitosis de los condrocitos y osteoblastos, la síntesis del colágeno, y promueve el crecimiento óseo en longitud y diámetro). Pero el hígado es uno de los tejidos diana más importantes para GH (Takahashi 2012). El músculo esquelético y el tejido adiposo se configuran como dos de los tejidos

blancos esenciales para la actividad hormonal (Etherton 2000). En principio, la acción sobre el músculo sería de carácter anabólico y sobre el tejido adiposo sería catabólico. El efecto varía en función de la dosis administrada de GH (McLaren, Bechtel *y col.* 1990), de la etapa de crecimiento, del sexo y de la dieta (Kanis, Nieuwhof *y col.* 1990).

Crecimiento

La GH estimula el crecimiento muscular activando la proliferación celular y la acreción de la proteína. Puede producir un aumento en la fuerza y capacidad muscular, y estimula el crecimiento lineal actuando de manera directa e indirecta (vía IGF-I) sobre el cartílago en crecimiento (Murray, Kim *y col.* 2004). La principal función de la GH es favorecer el crecimiento durante la infancia y adolescencia, en conjunción con otros factores nutricionales y otras hormonas sexuales y tiroideas. Actuando sobre los cartílagos en crecimiento, aumentaría el tamaño de los huesos largos durante infancia hasta la pubertad. En este momento se produciría la osificación de los huesos por acción de las hormonas sexuales. Así, el déficit hormonal producirá el cese o disminución del crecimiento lineal y el tratamiento con GH estimularía la condrogénesis y la aparición de osteoblastos (Ohlsson, Bengtsson *y col.* 1998). Además presentaría acción directa sobre músculo cardíaco, diafragma, adipocitos, células hematopoyéticas y hepatocitos. Las acciones sobre el crecimiento serían de tiempo limitado, mientras que las acciones metabólicas y cardiovasculares del eje GH/IGF-I durarían toda la vida (Daughaday, Trivedi *y col.* 1981).

La secreción media diaria de la hormona en el animal se ha relacionado positivamente con el crecimiento del tejido magro y negativamente con el tejido adiposo corporal (Trenkle 1978). Este efecto se produce por las actividades lipolíticas y proteogénicas de GH (Machlin 1972).

Otras acciones

Entre otras de las acciones que desempeña la GH, las más significativas después del crecimiento son:

- *Aumento de la lipolisis* (Jorgensen, Moller y col. 2007) y la oxidación de lípidos, lo que contribuye a la movilización de los triglicéridos almacenados, aumentando los niveles de ácidos grasos libres. También estimula la oxidación de ácidos grasos, sobre todo en períodos de ayuno (Vijayakumar, Novosyadlyy y col. 2010). Va a aumentar la lipolisis actuando sobre la actividad de la enzima lipasa HSL (Johansen, Richelsen y col. 2003) y/o por influencia en la diferenciación de preadipocitos a adipocitos (Vijayakumar, Novosyadlyy y col. 2010), predominantemente sobre el tejido adiposo visceral (Freda, Shen y col. 2008). Los efectos supresores de GH sobre el depósito graso dependen de la etapa de la vida del animal. En jóvenes, la hormona disminuye la síntesis *de novo* de la grasa, mientras que los animales que crecen más lentamente, más viejos, la lipolisis puede ser el mecanismo principal de la depleción de grasa (Grant, Helferich y col. 1991). La capacidad de GH para disminuir el depósito graso está determinada por los efectos sobre la síntesis y movilización lipídica. En estudios en rata (Doris, Vernon y col. 1994) y hombre (Marcus, Margery y col. 1994), se demuestra que el tratamiento con GH aumenta la lipolisis en tejido

adiposo y disminuye los TG. La acción de GH parece ser directa y no mediada por factores de crecimiento insulínicos (Marcus, Margery *y col.* 1994).

Los individuos con deficiencia de GH tienen masa grasa corporal aumentada (Murray, Adams *y col.* 2004) y las concentraciones de leptina están elevadas. Así, existe una correlación positiva entre grasa corporal y leptina (Fors, Matsuoka *y col.* 1999). El tratamiento con GH origina una disminución en ambos parámetros (Hoffman, Kuntze *y col.* 2004). Algunos autores relacionan los cambios en los valores de leptina con modificaciones de grasa corporal e IMC (Matsuoka, Fors *y col.* 1999), sin embargo otros sugieren que son independientes (Lanes, Soros *y col.* 2005).

Los niveles plasmáticos de leptina y adiponectina estarían relacionados con la obesidad y el síndrome metabólico. Así, la leptina se asociaría directamente con un aumento de masa grasa corporal, mientras que en la adiponectina la asociación sería negativa. La adiponectina aumentaría la sensibilización a la insulina (Albert, Haas *y col.* 2007).

Los individuos obesos presentarían deficiencia funcional de GH y niveles de secreción anormales. Después de tratamiento con GH no se observarían cambios importantes en los niveles de leptina, pero si aumentarían significativamente los valores de IGF-I y se reduciría moderadamente la grasa corporal (Albert, Haas *y col.* 2007).

▪ *Efecto anabolizante.* La GH estimula el transporte y la captación de aminoácidos por los tejidos, acelerando la síntesis de proteínas y la formación de colágeno. Esto provoca un balance positivo de nitrógeno y fosforo. La marcada acción anabolizante

de la GH se hace patente de forma inmediata tras la administración de la hormona a niños GH-deficientes por activación de todos los procesos implicados en la neosíntesis proteica. Aunque los efectos anabolizantes de la GH ocurren en tejidos tan variados como hueso, cartílago, músculo, hígado..., es en el músculo e hígado donde alcanzan mayor expresión. A nivel muscular, se observa un incremento de transporte de aminoácidos al interior de la célula, que aparece rápidamente y es bloqueable por inhibidores de la síntesis proteica. Unas horas más tarde hay un claro aumento del RNA ribosómico, de la síntesis de DNA y neosíntesis proteica. Estos mismos fenómenos ocurren en el hígado, donde la GH promueve la síntesis de gran número de proteínas (entre ellas las IGF-I). La síntesis de nuevas proteínas es un fenómeno clave para el crecimiento, tanto somático como visceral. El crecimiento somático va a efectuarse a expensas del crecimiento óseo que, tras el nacimiento, va a ser directamente dependiente del sistema GH/IGF-I (Tresguerres, Blanco y col. 2003).

Las acciones anabólica y antilipogénicas por administración exógena de GH son inequívocas, pero el impacto que los componentes de la dieta (energía, proteína y minerales, así como sus modificaciones en la dieta) pueden tener sobre la acción promotora del crecimiento producido por GH, es muy poco conocido. La actividad GH sobre el metabolismo proteico es más relevante si se está realizando algún ejercicio que en reposo (Moller, Vendelbo y col. 2009).

▪ *Antagoniza la acción de la insulina.* La GH estimula la expresión del gen de la insulina, pero, a la vez, induce resistencia a la acción de la insulina. Se inhibe la captación de glucosa por las células musculares y adiposas, aumentando la

concentración de glucosa plasmática. Se observa una hiperinsulinemia compensadora (Genuth, Nathan *y col.* 2001). El efecto antiinsulínico de GH sobre el tejido adiposo parece ser debido a que la hormona inhibe la unión de la insulina a su receptor (Davidson, Shen *y col.* 1987). El bloqueo de receptores de insulina en el tejido adiposo aumenta la longevidad en ratones. En el ser humano, de manera similar al ratón, una mayor sensibilidad a la insulina y unos menores niveles de insulina, están asociados a un menor riesgo de padecer enfermedades relacionadas con la edad y a una mayor supervivencia (Bartke 2008).

La administración de IGF-I a voluntarios sanos produce una rápida hipoglucemia (Guler, Zapf *y col.* 1987).

En el envejecimiento de roedores y humanos se observa una mayor resistencia a la insulina, un descenso en las actividades metabólicas y una disminución en las funciones inmunitarias. Estos procesos conllevan a un aumento en la actividad inflamatoria, causando daño tisular a largo plazo y una inflamación crónica sistémica. Los ratones más longevos han mejorado la respuesta a la insulina y han aumentado la liberación de adipoquinas anti-inflamatorias. La reducción de la inflamación puede ser un mecanismo para aumentar la longevidad (Masternak *y* Bartke 2012).

Relación GH con el sistema cardiovascular

La GH desempeña un papel muy importante en el funcionamiento del sistema cardiovascular, siendo reguladora fisiológica en el crecimiento del miocardio y en su rendimiento (Lombardi, Colao *y col.* 1997). Se han descrito tanto actividades

antiapoptóticas (Jeay, Sonenshein *y col.* 2000); (Segard, Moulin *y col.* 2003) como proapoptóticas (Kiya, Endo *y col.* 1999). Existe un aumento en la morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular en pacientes con deficiencia de GH, diagnosticada tanto en niñez como en edad adulta (Rosen 1997). Los adultos con deficiencia en GH presentan un incremento en diversos índices de riesgo cardiovascular tales como, hiperlipidemia (niveles elevados de colesterol y TG en ayunas), aumento de masa grasa corporal, aterogénesis prematura, disminución de actividad fibrinolítica, disminución en las concentraciones de folato y vitamina B12, aumento de resistencia periférica a la insulina, alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos y alteraciones en estructura y función cardíaca. Además, presentan una disminución en actividad de enzimas involucradas en los sistemas de defensa antioxidante y un aumento de peroxidación lipídica en ausencia de GH. El aumento de la edad está asociado a un aumento de peroxidación y de LDL-colesterol, por lo que son frecuentes las enfermedades cardiovasculares (Lanes, Paoli *y col.* 2003). Además se observa una mayor prevalencia de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Takahashi 2012). El déficit de GH se asocia a un perfil lipídico relacionado con aterosclerosis precoz: aumento de colesterol total, LDL y TG, y un descenso de HDL. Tras el tratamiento con GH a pacientes con déficit, se observa un descenso de colesterol total y LDL, no hubo cambio en los valores de TG (Sáez 1999).

Pacientes con déficit de GH presentan cifras de presión arterial inferiores a las de población sana. En respuesta al ejercicio, presentan un incremento de las cifras tensionales similar. Esto implica que GH tiene papel importante en el control de la presión arterial durante el reposo (Paya 2001).

Relación de GH con otras patologías

Cáncer

La sobreexpresión de GH en ratones está vinculada a una menor esperanza de vida y a desarrollo de tumores hepáticos (Bartke, Chandrashekar *y col.* 2002).

La disminución natural durante el envejecimiento de los niveles de GH, aunque produce alteraciones corporales, puede estar ofreciendo una protección importante contra el cáncer (Bartke 2008). Los cambios vinculados a la edad en las funciones tisulares y celulares se relacionarían con disminuciones en las hormonas GH e IGF-I. Están documentados los efectos de estas hormonas en huesos y masa muscular, pero en el efecto sobre el envejecimiento cerebral la bibliografía es más escasa. GH e IGF-I son beneficiosos en el envejecimiento cerebral (Sonntag, Lynch *y col.* 2000).

Estrés oxidativo

Las variaciones respecto al estrés oxidativo provocadas por GH dependen del órgano estudiado y del parámetro medido. Esto indica, que el efecto de la hormona es complejo (Sanz, Caro *y col.* 2005).

Sistema nervioso central (SNC) y cognición

El SNC también es un tejido diana para la GH. Un defecto de GH se asocia a alteraciones del sueño, con pérdida de memoria, sensación de bienestar disminuida y otras alteraciones cognitivas (Hayashi, Shimohira *y col.* 1992), que mejoran con el tratamiento con GH (Gibney, Wallace *y col.* 1999). En varios modelos de animales, la GH protege el sistema nervioso de los distintos tipos de degeneración. Este efecto

neuroprotector, sugiere que la disminución de esta hormona con la edad, puede afectar al cerebro y contribuir al deterioro del mismo (Gallagher, Bizon *y col.* 2003).

2.2.1.3 Administración exógena de GH

GH presenta la especificidad de especies en el hombre (Knobil y Greep 1959). La GH de los mamíferos es activa en numerosas especies, pero en el ser humano solo es activa si procede de humanos o primates (Hadley, Buckingham *y col.* 1992). A partir de ese momento, se supo que el hombre solo podía ser tratado con GH humana, por lo que había que desarrollar un método para obtenerla a partir de hipófisis de cadáveres (Raben 1957).

Su uso terapéutico comenzó en el año 1958, al inyectar a un paciente GH obtenida de la hipófisis de un cadáver y demostrar que sus preparados hormonales son activos en niños con enanismo hipofisiario (Raben 1958).

Se ha planteado la terapia con GH en ancianos (Rudman, Feller *y col.* 1990). Con la administración de hormona de crecimiento recombinante humana (rhGH) a dosis bajas en hombres mayores de 60 años, se alcanzan niveles de IGF-I y de lípidos plasmáticos similares a jóvenes con efectos beneficiosos como aumento de masa magra y disminución de masa grasa (Cuttica, Castoldi *y col.* 1997). En animales el tratamiento con GH también induce a una disminución de los depósitos grasos y a un aumento de la masa magra, pero se han encontrado valores de colesterol en plasma elevados (Ding, List *y col.* 2011).

Con la administración de GH se observan efectos beneficiosos sobre función cardiovascular (Castillo, Cruzado *y col.* 2003)), sobre la piel, sobre sistema inmunitario (Baeza, Alvarado *y col.* 2009) y sobre el tejido del SNC (inhibiendo la

apoptosis por modificación de los niveles de las moléculas implicadas en la cascada, ya sea, disminuyendo la expresión de las caspasas o de las proteínas pro-apoptóticas o aumentado los valores de Bcl2). También se observa una disminución del indicador de estrés oxidativo LPO (Paredes, Forman *y col.* 2014).

Efecto de la administración exógena de GH a nivel cardiovascular

A nivel cardíaco, GH e IGF-I, participan en la regulación del crecimiento del corazón durante el desarrollo y en el mantenimiento estructural (Colao, Marzullo *y col.* 2001). La secreción de GH interviene en el desarrollo cardíaco postnatal. Esto se comprobó con ratas hipofisectomizadas, donde la expresión en el corazón del RNAm de IGF-I está disminuida. La administración exógena de GH fue capaz de revertir la situación, aumentando los niveles proteicos de IGF-I en el corazón (Flyvbjerg, Jorgensen *y col.* 1991). Los efectos de GH sobre miocardio están mediados por mecanismos directos e indirectos (a través de IGF-I) (Silverman y Friedlander 1997).

La administración exógena de GH, IGF-I o de ambas hormonas, produce un aumento en el tamaño del ventrículo izquierdo en ratas adultas sin desarrollar fibrosis. El efecto hipertrófico de GH podría tener relevancia clínica en el tratamiento de la cardiopatía dilatada que se produce como respuesta a HTA, infarto de miocardio, arritmias o problemas endocrinos (Cittadini, Stromer *y col.* 1996). La administración de GH a pacientes con esta enfermedad ha producido una mejora en la eyección y un aumento en la masa del ventrículo izquierdo (Perrot, Ranke *y col.* 2001). El exceso y el defecto de GH, producen empeoramiento de la función cardíaca (Sacca, Cittadini *y col.* 1994). En ratas con estenosis aortica, la administración de GH ejerce efectos

beneficiosos aumentando los valores de las defensas antioxidantes, reduciendo el estrés oxidativo y mejorando la generación de energía en el miocardio de las ratas con insuficiencia cardíaca (Seiva, Berbert y col. 2010).

En los pacientes con deficiencia de GH se produce disfunción endotelial arterial. Esta deficiencia revierte con el empleo de GH recombinante humana (Graham, Evans y col. 2008).

La administración de GH originaría un aumento en el peso del corazón y del hígado (Liu y LeRoith 1999).

Efecto de la administración exógena de GH a nivel hepático

En el envejecimiento se produce una disminución en la capacidad de regeneración hepática. La GH estaría relacionada con la regeneración. La administración de la hormona a ratas viejas parcialmente hepatectomizadas aumenta la proliferación de hepatocitos (Schmucker y Sanchez 2011).

Se han determinado los efectos in vitro de GH e IGF-I sobre las enzimas antioxidantes de hepatocitos de ratón. Se detectó una disminución superior de los niveles de catalasa, de superóxido dismutasa y de glutatión peroxidasa en células tratadas con GH respecto a IGF-I. Estos resultados sugieren que GH e IGF-I disminuyen la capacidad de los hepatocitos para contrarrestar el estrés oxidativo (Brown-Borg, Rakoczy y col. 2002). El uso de GH revierte valores elevados de LPO en adultos con deficiencia de GH. En ratones Ames enanos GH-deficientes sometidos a tratamiento con GH se ha observado un aumento de peso corporal y hepático, y una disminución de la cantidad de catalasa en hígado, riñón y corazón. La actividad

de la misma se redujo en riñón y corazón. También se han encontrado niveles de glutatión peroxidasa inferiores en hígado, riñón y músculos. Su actividad es menor en hígado y riñón. Respecto a glutatión, los niveles están aumentados en cerebro, músculos e hígado. La GH suprime los sistemas que contrarrestan el estrés oxidativo. La reducción de GH contribuye al aumento en la longevidad (Brown-Borg y Rakoczy 2003).

Efecto de la administración exógena de GH sobre el crecimiento

La administración de GH in vivo a animales GH-deficientes, origina un crecimiento acelerado (Daughaday y Trivedi 1991). Añadida a cultivos celulares o de músculo, ejerce efectos poco consistentes. La estimulación de la condrogénesis depende del incremento de IGF-I y no de la acción directa de GH. Por el contrario, se han encontrado efectos directos de GH sobre la diferenciación y proliferación celular (Isaksson, Jansson y col. 1982). En ratas normales, la inyección local de GH determina el aumento en el crecimiento longitudinal del miembro inyectado (Thorngren y Hansson 1974). En ratones Ames a los que se administraron dos inyecciones de GH diarias, se observó un aumento en su crecimiento respecto a los controles, pero disminuyó la sensibilidad a la insulina. Por ello, la mejora en el crecimiento puede afectar negativamente a la calidad de vida y a la longevidad (Masternak, Panici y col. 2010).

El objetivo del tratamiento con GH en la infancia y adolescencia ha sido hasta la obtención del máximo de crecimiento lineal. La supresión del tratamiento en adultos jóvenes produce efectos desfavorables en la masa ósea, composición corporal y perfil lipídico. Esto se asocia con una mayor mortalidad. Los niños con deficiencia

en GH deberán ser observados a medida que entran en el periodo adulto, por presentar un riesgo cardiovascular elevado que pueda contribuir a una mayor morbilidad a una temprana edad (Lanes, Paoli *y col.* 2003).

El tratamiento con GH aumenta la síntesis proteica sin alteración de la degradación, en terneros (Boisclair, Bauman *y col.* 1994), corderos (Eisemann, Hammond *y col.* 1989), humanos (Fryburg y Barrett 1993) y ratones Snell enanos (Bates y Pell 1991). En cerdos se ha observado un aumento del anabolismo muscular por estimulación de las tasas de síntesis y degradación proteicas (Seve, Ballevre *y col.* 1993). El mecanismo por el que la hormona aumenta el depósito proteico está influenciado por el estado nutritivo del animal. Así, en animales jóvenes, de rápido crecimiento y con baja ingesta proteica, en el tratamiento con GH se produce disminución del catabolismo y mejora el balance proteico. Al aumentar la ingesta de proteínas, se produce aumento de la síntesis sin modificar la tasa de proteólisis. La administración de GH parece precisar unos niveles mínimos de proteína en la dieta. El estado nutritivo determina un papel fundamental importante en la regulación de la secreción de GH. Así, un exceso o un déficit en nutrientes influirían, de forma diferente y con carácter edad-dependiente (en las primeras etapas de vida, el eje es muy sensible a las modificaciones dietéticas y durante el periodo del destete, cuando el eje está desarrollado, la sensibilidad es menor), en la maduración y función del eje somatotrópico en distintas especies. Un déficit de proteínas podría afectar al receptor de GH y a los mecanismos de secreción y acción de GH, a la formación y función de IGF-I y a las proteínas transportadoras de GH y de IGF-I. El nivel de nutrición requerido para que se produzca un efecto óptimo del eje no se ha definido.

GH induciría a un incremento en la eficiencia de utilización de la proteína de la dieta (Vann, Nguyen y col. 2000).

En animales no obesos se ha encontrado un aumento en la acumulación de proteína corporal (Roberts, Azain y col. 1995).

En humanos no obesos, la restricción energética de la dieta aumenta los niveles de GH. En personas obesas no se produce este aumento (Grottoli, Gauna y col. 2003). La administración de GH se asocia con aumento en valores de IGF-I. En ratas adultas, este aumento no se produce si existe restricción energética (Sanz, Gredilla y col. 2005).

Efecto de la administración exógena de GH sobre composición corporal y depósitos grasos

En los pacientes adultos, la GH colabora en el mantenimiento de la composición corporal y promueve la reparación de tejidos. La influencia sobre la composición corporal, metabolismo y estructura, incluyendo las funciones del SNC, como sueño y cognición, se demuestra en adultos con deficiencia de GH cuando son sometidos a terapia con administración subcutánea de GH recombinante humana (Giordano, Bonelli y col. 2008).

El tratamiento con GH recombinante humana en ratones produce un aumento en peso corporal y masa corporal magra. No se observa aumento de liberación de IGF-I. La determinación de este parámetro no es un marcador seguro en el tratamiento con GH (Bielohuby, Schaab y col. 2011).

En humanos adultos con deficiencia de GH la administración de GH, por su efecto lipolítico, reduce la grasa abdominal y visceral (Rasmussen 2010). Junto con la dieta y ejercicio físico se reduciría su riesgo cardiovascular (Attallah, Friedlander *y col.* 2006). Respecto al peso, no se han observado diferencias significativas (Rasmussen 2010).

GH reduciría la masa grasa en adultos obesos (Kim, Nam *y col.* 1999) y aumentaría los valores plasmáticos de IGF-I (Albert, Haas *y col.* 2007).

.En animales viejos, se observa que la administración de GH es beneficiosa para la composición corporal (disminuye el peso de la grasa) y mejora la función vascular (Castillo, Cruzado *y col.* 2005).

La administración de GH en ratas viejas y obesas, produce disminuciones en los valores de tejido adiposo y de ingesta voluntaria de alimentos (Malmlof, Din *y col.* 2002). En ratas viejas y no obesas, se observa un aumento en el peso corporal y de ingesta de proteínas (Veyrat-Durebex, Gaudreau *y col.* 1999).

En personas ancianas, la administración de GH produce mejoras en la composición corporal, pero existe un aumento de las evidencias que relacionan GH y cáncer (Bartke 2008). No existen estudios definitivos respecto a la seguridad en la utilización de GH a largo plazo en individuos de edad avanzada. El mejor enfoque sería utilizar moléculas con efecto liberador de GH (Giordano, Bonelli *y col.* 2008).

Efecto de la administración exógena a nivel cerebral

El tratamiento con GH a dosis que consiguen restaurar los niveles de IGF-I plasmáticos hasta alcanzar los de los adultos, es capaz de evitar la disminución del

número de neuronas con la edad (Azcoitia, Perez-Martin *y col.* 2005). El mecanismo neuroprotector de la GH está relacionado con la disminución de la apoptosis de las neuronas. Esto parece confirmarse porque en homogenizados cerebrales hay un aumento de Bcl-2 y glutatión peroxidasa, y una disminución de caspasas-3 y -9 y de los indicadores de estrés oxidativo y de inflamación (Fernandez-Tresguerres 1998).

La mayoría de las alteraciones que aparecen a nivel cerebral con el paso del tiempo, ocurren debido a incrementos de estrés oxidativo y de la inflamación. La administración exógena de GH a niveles fisiológicos es capaz de revertir algunas de las alteraciones.

En ratas adultas que presentan una lesión cerebral, se ha demostrado que una terapia con administración de GH combinada con rehabilitación es efectiva para la recuperación de las funciones motoras, si se inicia inmediatamente después de producirse la lesión (Heredia, Fuente *y col.* 2013).

Utilización terapéutica de GH

En 1985 se comercializó la primera GH recombinante humana (rhGH), y comenzó a utilizarse en niños. El tratamiento permite una normalización en los valores de IGF-I y un aumento de la tasa de crecimiento hasta obtener una talla adecuada para su edad, a partir del tercer año. Además, se evitan las consecuencias fisiológicas y psicológicas que se producen en el caso de la deficiencia de GH.

A mediados de la década de los noventa empezó a tener uso en adultos. El tratamiento permite una mejoría metabólica (a nivel cardiovascular y muscular) y de la composición corporal (Carrascosa, Audi *y col.* 2011).

En pacientes adultos altas dosis de rhGH antagonizan las acciones de la insulina. Altas dosis en pacientes sanos y con deficiencia de GH conducen al desarrollo de resistencia a la insulina y aumento de grasa visceral. Administrando pequeñas dosis de rhGH (0,1 mg/día) se mantiene el funcionamiento normal de las células β pancreáticas y se retrasa la diabetes tipo 2 en pacientes con alto riesgo (Yuen y Dunger 2006).

Con administración de rhGH a ancianos sanos (Munzer, Harman *y col.* 2001) y a ratas viejas machos de 18 meses (Parini, Angelin *y col.* 1999), no se produciría el aumento edad-dependiente de los niveles plasmáticos de colesterol y, además, se observaría un descenso de la hipercolesterolemia. Se produciría un efecto parecido en adultos GH-deficientes, donde se observarían mejoras en valores de colesterol total y LDL (Simpson, Savine *y col.* 2002).

En el envejecimiento aparecen desordenes hormonales y metabólicos. Se producen alteraciones proteicas que pueden relacionarse con disminuciones de los valores de GH e IGF-I en plasma (Veyrat-Durebex, Gaudreau *y col.* 1999)

La terapia sustitutiva con rhGH en ancianos, modificaría la composición corporal y los niveles de lípidos plasmáticos, aumentando la masa magra, disminuyendo la masa grasa, reduciendo los niveles de colesterol y mejorando la relación HDL/LDL (Angelopoulos, Seip *y col.* 1998). Pero esta terapia no está exenta de efectos secundarios. Así, tratamientos a dosis elevadas durante períodos de tiempos prolongados pueden producir disminución a la sensibilidad de la insulina e intolerancia a la glucosa y retención de líquidos (Holloway, Butterfield *y col.* 1994).

2.2.2 INFLUENCIA DE LA DIETA EN EL ENVEJECIMIENTO

2.2.2.1 Efectos de la restricción energética (RE)

A lo largo de la historia de la humanidad muchas sociedades han reconocido los efectos beneficiosos que la limitación en el consumo de alimentos, bien por cuestiones religiosas o bien por escasez de comida, ejerce sobre la salud y el bienestar general. La restricción energética (RE) que consiste en la disminución de 30 a 60% de la alimentación *ad libitum*, sin llegar a la malnutrición, es la manipulación experimental mejor conocida capaz de descender la tasa de envejecimiento y de incrementar la longevidad media y máxima de los animales (Mercken, Carboneau y col. 2012). Las dietas con restricción energética no deben aplicarse indiscriminadamente a todos los individuos. Se deben tener en cuenta factores como edad (las necesidades energéticas y la dieta consumida disminuyen con la edad), estado nutricional y patologías de cada paciente (Frame, Hart y col. 1998). La RE de 40% a largo plazo en ratas, comenzando temprano tras el destete, aumenta la longevidad máxima (McCay, Crowell y col. 1935). También se ha observado un aumento en la longevidad en un amplio rango de organismos, incluyendo levaduras, rotíferos, arácnidos, nematodos, roedores, primates y humanos (Mattison, Roth y col. 2007). La longevidad es mayor cuando el nivel de restricción de alimentos es medio. A concentraciones muy bajas de proteínas y energía se produce desnutrición y disminución de longevidad (Cho, Rha y col. 2012)). El incremento de longevidad es proporcional a la duración del tratamiento y a la intensidad del mismo (Pugh, Oberley y col. 1999). Las dietas restrictivas que permiten bajar la tasa metabólica, prolongan la vida de los individuos que se sometieron a ellas a partir de la edad adulta (Sohal y Weindruch 1996).

La aplicación de la restricción energética causa cambios importantes en procesos metabólicos que conducen a retrasar los efectos del envejecimiento (reparación del DNA, regulación del metabolismo de la glucosa, respuesta inmune, actividad de diferentes hormonas, capacidad cognitiva, hipertrofia muscular o síntesis proteica) (Weindruch 1996). Se observa un retraso en la aparición de enfermedades vinculadas al envejecimiento como sarcopenia, problemas cardiovasculares, obesidad, diabetes, cáncer (Anderson, Shanmuganayagam y *col.* 2009) y deterioro psicomotor (Ingram, Weindruch y *col.* 1987). También se produce una atenuación en la incidencia y progresión de enfermedades como la hipertensión, autoinmunes y varias alteraciones neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer (Martin, Mattson y *col.* 2006). En general, son bien conocidos los efectos beneficiosos que la restricción energética en la dieta ejerce sobre el envejecimiento: mayor longevidad (Ward y Richardson 1991), reparación del DNA dañado, disminución del estrés oxidativo mitocondrial (Barja 2004) y aumento en la defensa antioxidante (Feuers, Weindruch y *col.* 1993)

Los cambios metabólicos subyacentes a la RE han sido estudiados en mamíferos. Durante la fase inicial adaptativa, el metabolismo, estimado como consumo de oxígeno, disminuye. Como respuesta inmediata a los bajos niveles de glucosa, los animales restringidos degradan rápidamente los almacenes de glucógeno y, cuando dichos almacenes se reducen, las grasas empiezan a romperse para compensar la ausencia de glucosa en sangre (Bertrand, Lynd y *col.* 1980). Así, junto con la pérdida de masa grasa, otros de los muchos cambios fisiológicos inducidos por la RE incluyen descensos en la temperatura corporal y en los niveles de la hormona del crecimiento, IGF-I, hormona estimulante del tiroides y gonadotropinas. En cambio,

los niveles de glucocorticoides, catecolaminas y glucagón, se incrementan (Mobbs, Bray y col. 2001). Los animales restringidos presentan menores niveles de glucosa e insulina en plasma, junto con una mayor sensibilidad a la insulina que los alimentados *ad libitum*. También, como consecuencia de los descensos en los niveles de gonadotropinas, se han observado retrasos en la maduración sexual y en la fertilidad. La modificación de la vía de señalización insulina/IGF-I en animales sometidos a RE tiene particular interés, ya que se trata de un sistema altamente conservado a lo largo de la evolución que ha sido propuesto como regulador de la longevidad en una amplia variedad de animales, desde nematodos hasta mamíferos (Gems y Partridge 2001).

Aunque los efectos de la RE sobre la tasa de envejecimiento y el incremento en la longevidad máxima están bien documentados en diversas especies, todavía no se han esclarecido los mecanismos moleculares subyacentes. De acuerdo con la teoría mitocondrial de envejecimiento por radicales libres, la RE trabaja disminuyendo el estrés oxidativo mitocondrial (Lopez-Lluch, Irusta y col. 2008). Los efectos de la RE sobre la producción de ROS por parte de las mitocondrias han sido investigados en ratones y ratas, aplicando un 40% de RE, y se observa que la RE a largo plazo disminuye significativamente la generación mitocondrial de ROS en músculo esquelético, riñón, corazón, hígado y cerebro (Sanz, Caro y col. 2005). Sin embargo, cuando la restricción se aplica a corto plazo (de unas pocas semanas a 4 meses), los descensos se detectan o no en función del tejido estudiado. Por ejemplo, en hígado de rata 6-7 semanas de RE son suficientes para descender la tasa mitocondrial de ROS y el daño oxidativo al DNA mitocondrial (Gredilla, Barja y col. 2001). La disminución en la tasa de producción de ROS es un mecanismo común utilizado

tanto por animales longevos como por animales sometidos a RE con el objeto de disminuir el estado basal de lesión oxidativa a carbohidratos, lípidos, proteínas y especialmente al DNA mitocondrial y, por tanto, de sus mutaciones y de la tasa de envejecimiento (Pamplona y Barja 2006). La RE, además, va a mejorar los niveles de antioxidantes intracelulares (Lee, Klopp y col. 1999).

La RE incide en las dianas de la protección frente al ROS (generación, detoxificación y corrección del daño) (Speakman y Mitchell 2011). Reduce la producción de ROS (Ash y Merry 2011), disminuyendo la producción del radical superóxido en el complejo I de la cadena de transporte de electrones (Barja 2004). A nivel de la protección, la RE evita el descenso producido en el envejecimiento en los niveles hepáticos de glutatión reducido y de las actividades enzimáticas de superóxido dismutasa y catalasa (Chen y Yu 1996).

Las membranas celulares de los animales sometidos a restricción energética se encuentran más protegidas frente a la acción de ROS, porque disminuye el grado de insaturación favoreciendo la acumulación de los ácidos grasos de cadena corta y con menor número de insaturaciones (linoleico y linolénico). Esta protección se asocia con el descenso en los niveles de hormonas como insulina y tiroideas T_3 y T_4 (Laganier y Yu 1993).

El aumento de supervivencia utilizando suplementos con vitamina E, restricción energética, aumento en actividad neurológica y ejercicio físico moderado; mejoran la disfunción mitocondrial cerebral y hepática en ratones viejos (Navarro y Boveris 2007). La restricción energética en ratas adultas aumenta los niveles de GH a valores similares a ratas jóvenes alimentadas *ad libitum*. Un fallo en la regulación del mRNA

a nivel de la traducción de GH puede ser un factor que contribuya a la disminución de la secreción de GH observado en el envejecimiento (Sonntag, Xu *y col.* 1995)

En ratas adultas, alimentadas *ad libitum* o con restricción energética de un 40%, la administración de GH se asocia a un aumento en los niveles plasmáticos de IGF-I. Este aumento no se observa si existe RE (Jorgensen, Blum *y col.* 1991). Los efectos anabólicos de la GH pueden superar levemente a los que produce la RE (60%) en ratas Sprague Dawley de 4 semanas de edad (Carrillo, Rising *y col.* 1998).

El exceso de tejido adiposo debido a una ingesta aumentada de energía y una mínima actividad física aumentaría el riesgo de padecer cáncer. La restricción energética es eficaz en la prevención de muchos cánceres en ratones de laboratorio. En monos adultos, se ha observado una disminución de un 50% en la incidencia de cánceres, aunque se necesitan más estudios a nivel molecular para entender los mecanismos que ocurren en el organismo responsables del cáncer dependiente de la restricción energética (Fontana, 2009). Se ha observado disminución en la aparición de melanomas, hepatomas, tumores mamarios y linfomas. Este hecho podría deberse a una menor frecuencia de mutaciones en el DNA (Stewart, Koehler *y col.* 2005). La restricción energética también disminuye los valores de citoquinas inflamatorias y de los marcadores oxidativos que influyen en la proliferación del cáncer (Pallavi, Giorgio *y col.* 2012).

Cuando la ingesta energética es excesiva, sobre todo en las etapas críticas para el desarrollo, las prioridades fisiológicas son el crecimiento. Cuando ya no existe desarrollo, se produce obesidad que se caracteriza por una inflamación sistémica. La restricción energética mejora los parámetros asociados a respuesta inmune y

defensa antioxidante. La restricción energética con una dieta alta en grasas disminuye los niveles hepáticos de TG, colesterol total y leptina, mejora la tolerancia a la glucosa y el hígado graso. Se observa disminución del daño oxidativo en peroxidación lipídica (Ash y Merry 2011).

2.2.2.2 Efectos de la proteína de la dieta

La influencia que la proteína de la dieta tiene sobre el envejecimiento es poco conocida y controvertida. El efecto que ejercen las proteínas de la dieta sobre el metabolismo lipídico y la aterosclerosis ha sido objetivo de numerosos estudios.

Una restricción proteica de un 60% parece prolongar la longevidad en ratas (Yu, Masoro *y col.* 1982) y retrasa el avance de nefropatías y cardiopatías (Maeda, Gleiser *y col.* 1985). Con reducción proteica del 18 al 10% no se encuentran modificaciones significativas (Gedik, Grant *y col.* 2005). En ratas jóvenes se han descrito efectos pro y antioxidantes, con un 9% de restricción proteica, se encuentran incrementados los valores de glutatión peroxidasa y reductasa (Langley y Jackson 1994). En ratas Long-Evans, alimentadas con un 8% de lactoalbúmina estos valores disminuyen frente a los controles (20%), lo que favorece la producción de ROS (Huang y Fwu 1992).

Las modificaciones a nivel proteico de la dieta alteran el nivel de ingesta y la ganancia de peso corporal. La tasa de crecimiento de la rata aumenta progresivamente con el contenido proteico de la dieta y después disminuye (Mercer, Watson *y col.* 1981).

Estudiando el hígado irradiado de ratones adultos, la ingestión de una dieta con un 7% de proteína, aumenta la lipoperoxidación. Esto se debe a una disminución en los

niveles de vitamina C y glutatión, respecto a los controles (20%) (Shin, Yamada *y col.* 2002).

La malnutrición proteico-calórica aumenta significativamente la apoptosis en macrófagos de ratón al estimularse agentes pro-apoptóticos y la disminución de proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Rivadeneira, Grobmyer *y col.* 2001).

El aporte de una dieta del 8% de proteína a ratas en etapa fetal y neonatal, induce retardo en el crecimiento, alteración en el balance proliferación/apoptosis de células β -pancreáticas (reduciendo la proliferación e incrementando apoptosis) (Petrik, Reusens *y col.* 1999). La reducción en la dieta de 30 hasta 50% en proteínas en ratones adultos muestran un menor grado en incidencia y tasa proliferativa de neoplasia inducida y, también, muestran un aumento en longevidad (Chou, Pegram *y col.* 1991).

Una suplementación oral con aminoácidos atenuaría la extensión del daño que produce una isquemia en corazón de rata, disminuyendo la proporción de cardiomiocitos que sufren apoptosis y se observa liberación de caspasa-9 y de citocromo *c* (Scarabelli, Pasini *y col.* 2004), lo que indicaría que el adecuado mantenimiento de proteínas en la dieta disminuye los mecanismos de muerte celular programada y el deterioro orgánico. Este hecho es importante porque las necesidades proteico-calóricas, en particular, no se cubren en la mayoría de los ancianos (Arbones, Carbajal *y col.* 2003). En estas personas la ingesta diaria recomendada de proteínas es 0,8 gramos/K/día. La disminución de la ingesta puede ser hasta un 30% menor que en adultos (Morley 1997), lo que conduciría a una

pérdida ponderal asociada a un estado de malnutrición, que conllevaría a enfermedades propias de la vejez.

Las causas de la anorexia de la vejez van a depender de diversos factores: sociales, culturales, psicológicos, ambientales, farmacológicos, funcionales y patológicos, que alteran el control de la ingesta (Chapman 2004). En ratas viejas, se ha descrito una preferencia por la grasa a expensas de los carbohidratos y una disminución en la ingesta proteica edad-dependiente (Veyrat-Durebex y Alliot 1997), que puede estar unida a una sensibilidad menor a la concentración de algunos aminoácidos (Volpi, Mittendorfer y *col.* 1999). El aumento de proteínas utilizando suplementos se ha asociado con una mayor fuerza y ganancia de masa muscular. Es importante que las proteínas, entre otros nutrientes, sean ingeridas en cantidades adecuadas para poder paliar la depleción muscular, puesto que la capacidad de síntesis proteica del músculo esquelético se mantiene en individuos viejos cuando se les infunde una carga de aminoácidos (Rasmussen 2010).

La modificación en la distribución de la grasa, aparición de obesidad y disminución de la sensibilidad tisular a la insulina, están asociadas directamente con altos niveles basales de glucosa, colesterol y TG, característicos de la vejez, mientras que se relaciona inversamente con HDL (DiPietro, Katz y *col.* 1999). También se ha descrito un estado de resistencia periférica a la insulina relacionado con el incremento graso en la vejez (Ferrannini, Vichi y *col.* 1996), así como una mayor intolerancia a la glucosa y una menor actividad de las células β -pancreáticas (Basu, Breda y *col.* 2003).

Una restricción proteica provoca en ratas alteraciones hepáticas en corto período de tiempo (cambios en la expresión de genes y variaciones en los niveles de serina, glicina, taurina y metionina) (Kalhan, Uppal *y col.* 2011).

.La desnutrición proteica en la primera etapa de la vida, impide un desarrollo en el crecimiento físico en humanos y ratas, por alteraciones a largo plazo en GH. Para probar esta hipótesis se utilizaron ratas macho destetadas (3-6 semanas de edad) alimentadas con dieta del 4% de proteínas frente a dieta normal con un 23% de proteína. Las ratas que recibieron dieta baja en proteínas presentan menores niveles de secreción pulsátil de GH y se reduce la respuesta secretora de insulina a la glucosa en la edad adulta (Harel y Tannenbaum 1995).

GH tiene efectos positivos en la recuperación de músculo esquelético, después de una malnutrición prolongada. Si se administra a las ratas una dieta enriquecida en proteínas y energía se promueve solamente un aumento en los depósitos grasos (Gautsch, Kandl *y col.* 1999).

2.2.2.2.1 Efectos de la lactoalbúmina como ingrediente de la dieta

La lactoalbúmina (principal proteína del lactosuero de la leche humana) se encuentra en la leche de vaca en una concentración de 1-1,5 g/L. La lactoalbúmina, como fuente de triptófano, ha demostrado beneficios neurológicos en humanos adultos (Markus, Olivier *y col.* 2000). El triptófano, es un aminoácido precursor de la serotonina y de la melatonina. Ambos compuestos regulan el apetito, la saciedad, la percepción del dolor, la depresión y el ritmo del sueño. Además, se han comparado los efectos de la lactoalbúmina y caseína en el estrés y en las personas que utilizaron lactoalbúmina, se observaron menores casos de depresión y un mayor rendimiento

cognitivo (Lien 2003). Se ha encontrado una forma multimérica de α -lactoalbúmina con actividad antitumoral selectiva (Hakansson, Zhivotovsky y col. 1995). Esta proteína unida al ácido oleico también posee actividad frente a los tumores celulares y se ha demostrado *in vivo* un efecto terapéutico específico en glioblastomas humanos y tumores en glándulas mamarias de ratón (Knyazeva, Grishchenko y col. 2008).

Además presenta actividad estimuladora del sistema inmune, en estudios *in vitro* (Jacquot, Gauthier y col. 2010) y en estudios *in vivo* (Saint-Sauveur, Gauthier y col. 2009); del crecimiento de bifidobacterias (Kee 1998). Hay varios estudios *in vitro* que demuestran una actividad antimicrobiana de los péptidos que se producen después de la digestión de esta proteína (Pihlanto-Leppala, Marnila y col. 1999). También se presenta una actividad antihipertensiva (Otte, Shalaby y col. 2007).

3. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo expuesto en la introducción el progreso de la edad lleva en todos los seres vivos al envejecimiento como un proceso ineludible que viene acompañado de una serie de procesos deletéreos. Estas alteraciones indeseables no son exclusivas de la vejez ya pueden aparecer en cualquier etapa de la vida y llevar a patologías e incluso a una muerte anticipada del individuo sobre el promedio de la especie. Ante estas circunstancias relacionadas con la vejez se investigan estrategias para intentar solucionar o al menos paliar los procesos asociados con el envejecimiento. El objetivo general de este estudio fue comprobar los efectos de la aplicación de dos estrategias antienvjecimiento: por un lado la estrategia endocrina consistente en la administración exógena de hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH); y por otro, la estrategia nutricional que propone el suministro de una proteína de alta calidad nutricional como es la lactoalbúmina.

Con ello, los objetivos concretos planteados en esta memoria de tesis doctoral fueron los siguientes:

- 1) Estudiar los efectos de la aplicación de dos estrategias antienvjecimiento en ratones BALB/c en dos etapas de la vida poco estudiadas, la madurez y la vejez: por una parte la administración exógena de la hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH), y por otra la alimentación con dietas con dos niveles de lactoalbúmina (14 y 20%) en la dieta.
- 2) Determinar los efectos de las estrategias seleccionadas, así como la diferencia de edad, sobre los parámetros ponderales, la ingesta, y la distribución de sustratos corporales, en especial la grasa y la proteína corporal, así como la razón proteína/grasa.

- 3) Determinar los efectos de las estrategias seleccionadas, así como la diferencia de edad, sobre el perfil lipídico y la actividad de la enzima paraoxonasa (PON1).
- 4) Evaluar los posibles efectos de los factores (EDAD, TRATAMIENTO y DIETA), así como de las posibles interacciones de dichos factores mediante el estudio de los análisis de la varianza correspondientes y el estudio posterior de las diferencias de grupos (comparación múltiple *post hoc*).
- 5) Realizar estudios comparativos con controles a dos niveles. Por una parte, con controles del tratamiento endocrino y nutricional, comparando los ratones tratados con rhGH frente a los salinos, así como entre los alimentados con la dieta del 20% frente a los del 14%; y en segundo lugar comparando ratones alimentados con las dietas experimentales con lactoalbúmina frente a controles alimentados con una dieta comercial control.
- 6) Realizar un estudio histológico del parénquima hepático para poder comprobar y comparar el estado de los hepatocitos entre los diversos grupos experimentales y controles.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 72 ratones BALB/c machos (Charles River, Barcelona, España). Se mantuvieron hasta que cumplieron las edades requeridas en el experimento, en el Animalario de la Sección Departamental de Fisiología (ES280790000085) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y se les suministraron alimentación y agua *ad libitum* (dieta A04, Panlab, Barcelona, España), con las condiciones ambientales controladas con ciclos de luz-oscuridad (12-12h) y de temperatura ($23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$). Se siguieron en todo momento las normas y leyes Españolas y de la Unión Europea al respecto. Este trabajo contó con la aprobación del correspondiente Comité de Ética de la Universidad Complutense de Madrid.

Los ratones se asignaron aleatoriamente a uno de los dos grupos de edad previstos en el experimento: adultos, que tendrían 6 meses de vida cuando se realizara el experimento con ellos; y viejos, que tendrían 18 meses de vida. Los dos grupos experimentales que difieren por la edad fueron: **adultos** (ratones con 6 meses de vida, n=36,) y **viejos** (ratones con 18 meses de vida, n=36).

El periodo experimental tuvo una duración de 30 días, que se inició después de transcurridos 7 días de adaptación a la dieta. A continuación, los animales se distribuyeron en jaulas individuales de metabolismo y con las mismas condiciones ambientales citadas. La dieta suministrada a cada uno de los ratones se determinó aleatoriamente entre la dieta control comercial A04 (Panlab, Barcelona, España) y cada una de las dos dietas experimentales isoenergéticas pero con distinta

proporción de proteína (lactoalbúmina), teniendo los siguientes grupos de dieta: **CC** (n=12, dieta control), **14** (n=12, dieta basal) y **20 %** (n=12, dieta hiperproteica).

También se determinó aleatoriamente el tratamiento que se administró a cada uno de los ratones alimentados con las dietas de lactoalbúmina, ya fuera hormona de crecimiento recombinante humana (rhGH) o solución salina isotónica (control salino). Con ello, la mitad de dichos ratones (es decir sin tener en cuenta a los CC) fueron **tratados con rhGH** y la otra mitad fueron **controles salinos**. La pauta seguida consistió en la administración, dos veces al día por vía subcutánea, de hormona de crecimiento recombinante humana (rhGH), (NovoNordisk S.A. España), en dosis de 2 µg/g peso ratón (tratados rhGH). En el caso de los controles salinos se les inyectó, de forma similar, solución salina fisiológica en dosis de 20 µL/g peso ratón. Se escogió la dosis de hormona de acuerdo con la bibliografía, en la que se describe su eficacia ya que produce efectos anabólicos tisulares (Kasukawa, Baylink y col. 2003).

En definitiva los diferentes grupos de ratones en el experimento vieron dados por los factores que intervienen sobre los parámetros que se van a estudiar. Estos **factores** fueron:

- EDAD: adultos o viejos.
- DIETA: 14 o 20 % (contenido de lactoalbúmina en la dieta).
- TRATAMIENTO: administración exógena de rhGH o solución fisiológica salina.

La medida del peso corporal y de la ingesta de cada ratón (alimento consumido menos el desperdiciado) se llevó a cabo cada dos días.

Finalizado el periodo experimental de 30 días, los animales se anestesiaron administrando una dosis intraperitoneal de una mezcla de ketamina (100 mg/Kg) y xilacina (5 mg/Kg). Se extrajo una muestra de sangre por punción retro-orbital y se recogió en tubos Eppendorf conteniendo EDTA (1 g/l) para la obtención del plasma y después de centrifugación a 1500 g a 4 °C, durante 30 minutos, se almacenó a – 20 °C.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les extrajo el hígado, tejido adiposo, corazón y los músculos, que se pesaron y se congelaron en nitrógeno líquido. Los órganos se mantuvieron en un congelador a – 80 °C hasta su utilización.

4.2. DIETAS EXPERIMENTALES

Las dietas experimentales se formularon con un contenido en nutrientes ajustado a las recomendaciones dietéticas de los animales utilizados, de acuerdo con los estándares AIN-93M (Reeves, Nielsen y *col.* 1993). Se sustituyó la proteína prevista inicialmente en AIN-93M, que es caseína, por lactoalbúmina.

Las dos dietas experimentales utilizadas contuvieron, por tanto, un 14% y un 20% de lactoalbúmina, respectivamente. Se comprobó la composición de las mismas utilizando la metodología más reconocida actualmente (AOAC International. 1995).

Composición de la dieta con 14% de lactoalbúmina

<i>Ingredientes</i>	<i>g/Kg dieta</i>
Lactoalbúmina	140,000
Almidón de maíz	465,692
Dextrinado de maíz	155,000
Sacarosa	100,000
Celulosa	50, 000
Minerales (AIN-93M)	35,000
Vitaminas (AIN-93VX)	10,000
L-Cistina	1,500
L-Arginina	0,700
Colina	2,500
t-Butilhidroquinona	0,008
Aceite de soja	40,000

Composición de la dieta con 20% de lactoalbúmina

<i>Ingredientes</i>	<i>g/Kg dieta</i>
Lactoalbúmina	200,000
Almidón de maíz	397,86
Dextrinado de maíz	132,000
Sacarosa	100,000
Celulosa	50, 000
Minerales (AIN-93M)	35,000
Vitaminas (AIN-93VX)	10,000
L-Cistina	1,500
L-Arginina	0,700
Colina	2,500
t-Butilhidroquinona	0,008
Aceite de soja	40,000

Minerales incluidos en las dietas experimentales (AIN-93M)

Ingredientes	mg/Kg dieta
Calcio	5000,0
Fosforo	1992,0
Potasio	3600,0
Sulfuro	300,0
Sodio	1019,0
Cloro	1571,0
Magnesio	507,0
Hierro	35,0
Cinc	30,0
Manganeso	10,0
Cobre	6,0
Yodo	0,2
Molibdeno	0,15
Selenio	0,15
Silicio	5,0
Cromo	1,0
Fluor	1,0
Niquel	0,5
Boro	0,5
Litio	0,1
Vanadio	0,1

Vitaminas incluidas en las dietas experimentales (AIN-93VX)

<i>Ingredientes</i>	<i>g/Kg dieta</i>
Ácido Nicotínico	3,000
Pantotenato cálcico	1,600
Piridoxina	0,700
Tiamina	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido Fólico	0,200
Biotina	0,020
Cianocobalamina	2,500
Vitamina E	15,000
Vitamina A	0,800
Vitamina D3	0,250
Vitamina K	0,075

4.3. DETERMINACIONES PONDERALES Y ANALÍTICAS

A fin de conocer las modificaciones que la interacción de la administración de hormona de crecimiento y el consumo de una dieta con alto contenido en proteína (lactoalbúmina) pudiera ejercer sobre los parámetros ponderales, la ingesta, y la distribución de sustratos corporales se determinaron los parámetros correspondientes, y en su caso se calcularon las variables derivadas de los citados parámetros.

Variables ponderales

Pesos

Peso inicial: peso del ratón al comienzo del experimento

Peso final: peso del ratón al final del experimento

Peso vacío: peso en canal del ratón

Ganancia de peso: incremento de peso del ratón (peso al final del experimento - peso al comienzo del experimento)

Órganos

Hígado: peso del hígado

Corazón: peso del corazón

Colon: peso del colon

Sóleo: peso del sóleo

Gastrocnemio: peso del músculo gastrocnemio

Cuádriceps: peso del músculo cuádriceps

Bíceps: peso del músculo bíceps

Depósitos grasos

Grasa abdominal: peso de la grasa abdominal

Grasa gonadal: peso de la grasa gonadal

Grasa subcutánea: peso de la grasa subcutánea

Suma de los depósitos grasos: suma de los pesos de los depósitos grasos

Ingesta y eficacia alimentaria

Ingesta total: ingesta acumulada del ratón durante todo el experimento

Ingesta proteína: ingesta acumulada de proteína de la dieta durante todo el experimento. Se calcula como “Ingesta total x contenido proteico de la dieta (0,14 ó 0,20)”.

Eficacia del alimento: Se calculó como “Ganancia de peso/ingesta total”.

4.3.1. Determinación de la composición corporal

Una vez extraídos los órganos, se procedió al pesado de la canal de los ratones (peso fresco), posteriormente realizó un secado inicial (50 °C), durante dos días, para su mejor manejo en las determinaciones de composición corporal. Una vez seca la canal se pesó (peso seco) y se trituyó hasta obtener un producto homogéneo. Se tomaron porciones de la mezcla para determinar humedad, proteínas, grasas y cenizas, según la citada metodología de la AOAC (AOAC International. 1995)

Determinación de la humedad corporal

Se realizó en crisoles de porcelana tarados. La mezcla corporal se mantuvo en estufa, a 60 °C durante dos días y luego a 100 °C hasta obtener un peso constante de la muestra.

Determinación del contenido de proteína corporal

Se empleó el método basado en el primitivo método Kjeldahl actualizado y semiautomático (Kjeltec, Foss-España), basado en la liberación y conversión del grupo amino de los aminoácidos en amoníaco, el cual se valoró posteriormente.

Determinación del contenido de grasa corporal

La determinación de la grasa se fundamenta en la obtención y pesada del residuo seco resultante de la maceración y percolación en Soxhlet, actualizado y semiautomático (Soxtec, Foss-España) después de evaporar en éter de petróleo.

Determinación de cenizas corporales

Las cenizas se miden gravimétricamente, tras incinerar en mufla a 550 °C (Select Horn, P-Selecta, Barcelona, España), durante un día, la materia orgánica de una muestra del triturado homogéneo citado.

Variables de composición corporal

Grasa (absoluta y porcentual),

Humedad (absoluta y porcentual),

Proteína (absoluta y porcentual),

Cenizas (absoluta y porcentual)

Relación proteína/grasa

4.3.2. Procesamiento de órganos

Se extrajeron y se pesaron el hígado, corazón, tejido adiposo, soleo, gastrocnemio, cuádriceps y bíceps de cada animal.

Posteriormente se introducen en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 °C, hasta su utilización.

Para analizar los parámetros se llevaron a cabo técnicas bioquímicas, que se realizaron en la fracción celular adecuada para cada marcador: fracción citosólica y fracción mitocondrial.

Todos los procesos y las soluciones se mantuvieron a una temperatura de 4 °C.

4.3.3. Procesamiento del hígado

Procedimiento

Se pesó un trozo de hígado y se homogenizó en 10 volúmenes (por peso de tejido) con tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4, conteniendo 5 mM de butil hidroxil tolueno

(BHT). Para la disgregación de la muestra se utilizó un homogenizador Potter-Elvehjem.

El homogenado se centrifugó a $800 \times g$ durante 10 minutos.

El sobrenadante obtenido se separó y se utilizó para la determinación de la peroxidación lipídica (LPO).

Todo el procedimiento se desarrolló a una temperatura de 4°C .

Otro trozo de hígado se pesó y se homogenizó en 1 mL de tampón de extracción por 0,1 g de tejido.

Se centrifugó el homogenado a $800 \times g$ durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó tres veces a $1000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . El sobrenadante obtenido contiene la fracción citosólica y en el sedimento queda la fracción mitocondrial que se utilizó para otros análisis.

Reactivos

▪Solución de tampón HEPES: manitol 38,26 g, sacarosa 23,96 g, HEPES 1,2 g, EDTA 0,292 g, agua destilada hasta completar 1 l. El pH ajustado a 7,5.

▪Solución de tampón de extracción: 210 mM manitol, 70 mM sacarosa, 5mM HEPES, 1 mM EDTA. El pH ajustado a 7,4.

4.3.4. Determinación de la muerte celular

El ensayo se basa en la detección específica de fragmentos de DNA asociados a histonas (mono y oligonucleótidos) mediante su determinación cuantitativa por enzimoimmunoensayo directo tipo “sandwich” (ELISA) utilizando anticuerpos monoclonales frente a DNA e histonas (Cell Death detection ELISA plus kit, Cat 774425, Roche Diagnostics).

El principio de la técnica se basa en la saturación y fijación de anticuerpos monoclonales anti-histona a los que se le añade anticuerpo anti-DNA peroxidasa (POD) que reacciona con los nucleosomas procedentes del DNA. La cantidad de peroxidasa retenida en el inmunocomplejo se contrasta con ABTS (2,2'-azino-bis-[sulfonato 3-etilbenzotiazolina] como sustrato. La riqueza en mono y polinucleosomas se mide a 405 nm en lector de placas frente al control. Los resultados se expresan en unidades de absorbancia por mg de proteína citosólica.

4.3.5. Determinación de la peroxidación lipídica hepática

El grado de peroxidación lipídica (Lipid peroxidation, LPO) en el homogenado de hígado se evaluó determinando su concentración en malonildialdehído (MDA) con tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 que contiene 5 mM de hidroxitolueno butilado (BHT). El ensayo se basa en la reacción del reactivo cromogénico N-metil-2-fenilindol en acetonitrilo (R1), con MDA y 4-hidroxinomenol (HNE) a 45 °C. El sobrenadante se incubó con R1 y ácido metanosulfónico a 45 °C durante 60 minutos.

Posteriormente se centrifugó a 12000 x *g* durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a una microplaca y se midió la absorbancia a 590 nm.

Para ello se utilizó el test de detección de peroxidación (Lipid Peroxidation Assay Kit. Calbiochem, EEUU). El resultado se expresó en nmoles de MDA/mg de tejido (Nakamoto, Tada *y col.* 2003).

4.3.6. Determinación de colesterol total, HDL-colesterol y triglicéridos

Para la determinación de estos parámetros se utilizaron ensayos colorimétricos comerciales (Biolabo S.A., Materlab, Madrid, España).

Se analizó el contenido plasmático en Triglicéridos (Esders y Nichirina, 1979), en Colesterol total (Allain *y col.*, 1974) y de la lipoproteína HDL (Gotto, 1988), mediante técnicas enzimáticas colorimétricas.

4.3.7. Cálculo del índice aterogénico.

Se calculó el índice aterogénico como $\text{Colesterol total} - \text{HDLcolesterol} / \text{HDLcolesterol}$ (Nus, Sanchez-Muniz *y col.* 2008).

4.3.8. Determinación de la actividad de la paraoxonasa (PON1)

La actividad sérica de arilesterasa en suero se determinó utilizando el método de Nus y col. (Nus, Sanchez-Muniz y col. 2006), que utiliza fluido corporal simulado (SBF) como tampón y fenilacetato (0,25 mM) como sustrato después de la adaptación al modelo de ratón (Nus, Sanchez-Muniz y col. 2008). El coeficiente de absorción molar del fenol, determinado espectrofotométricamente a 270 nm, 25 °C y pH 8, fue de 197/M por cm. La actividad de 1 unidad de arilesterasa equivale a 1 mol de fenilacetato hidrolizado/litro por minuto.

4.3.9. Cálculo de la razón PON1:HDL-colesterol.

Se calculó dicha razón como un marcador potencial de la capacidad antioxidante de HDL (Nus, Sanchez-Muniz y col. 2008).

4.3.10. Determinación de la leptina

Para la determinación de la leptina en suero de ratón se utilizó el inmunoensayo enzimático colorimétrico *Mouse Leptin Elisa (EZML-82K. Merck Millipore)*. La actividad se midió por espectrofotometría a 450 nm en un lector de placas.

4.3.11. Determinación de IGF-I

Para la determinación cuantitativa de este parámetro se ha utilizado el ensayo colorimétrico *Mouse/Rat IGF-I Immunoassay (PMG 100, R&S Systems)*. La microplaca se leyó a una absorbancia de 450 nm.

4.3.12. Determinación de glucemia

La extracción de la sangre se hizo de la vena de la cola de cada ratón. Las concentraciones de glucosa se determinaron con un glucómetro de la marca *Accu-check Aviva (Roche Diagnostics, S.L. España)*.

4.4 MÉTODOS MATEMÁTICOS Y ESTADÍSTICOS

Se presentan los resultados en tablas como medias aritméticas de los diferentes grupos experimentales en función de los factores considerados (EDAD, TRATAMIENTO, DIETA) y el error estándar de la media (media \pm EEM). También se calcularon y expresaron las medias de los grupos de ratones agrupados o segmentados por los diferentes factores de acuerdo a las comparaciones del apartado de resultados. En uno u otro caso, para expresar las diferencias entre valores de dos medias correspondientes a dos grupos se calculó el porcentaje de la diferencia entre las medias consideradas, tomando como referencia sobre la que se calcula esa diferencia el grupo de ratones que en cada caso se consideró base o control. Así, las comparaciones se hicieron frente a esos grupos control: viejos frente a adultos, administrados con rhGH frente a administrados con solución salina, o alimentados con la dieta del 20% frente a alimentados con la dieta del 20% de lactoalbúmina.

Para el procesamiento de datos se utilizó tanto la hoja de cálculo Excel (Microsoft Inc. EE. UU) como el paquete estadístico SPSS/PC en su versión 20 (SPSS v20 Inc. EEUU). Excel es de utilidad en la recopilación y el procesamiento primario de los datos, mientras que el paquete estadístico SPSS permite un análisis profundo de los datos, así como la definición de nuevas variables por utilización de las registradas experimentalmente, así como la elaboración de pruebas estadísticas y gráficos. Sin embargo, específicamente para la elaboración de gráficos se empleó el programa GraphPad Prism ya que cuenta con las mejores opciones para representar gráficos del estilo científico de este trabajo (GraphPad Prism, Inc, EE.UU).

Por defecto, el análisis estadístico de los datos se realizó mediante pruebas de estadística paramétrica, no obstante, en el caso de que se detectara que no se cumplieran los requisitos para este tipo de estadística se realizaría el análisis equivalente de estadística no paramétrica. Se comprobó precisamente si los datos se ajustaron a una distribución normal con la prueba de Shapiro-Wilk, que se considera superior a la más conocida de Kolmogorov-Smirnov (Motulsky 2014).

Para comprobar el efecto de los factores se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), en el que se estudió la significación (si $P < 0,05$, que indica la probabilidad de verosimilitud de la hipótesis nula, no hay diferencias debidas al factor en estudio) el efecto de cada factor (EDAD, TRATAMIENTO, DIETA) por separado, y si existieron interacciones significativas entre los factores, ya sean interacciones dos a dos (EDADxTRATAMIENTO, EDADxDIETA, TRATAMIENTOxDIETA) o una triple interacción (EDADxTRATAMIENTOxDIETA).

No solo se necesitó saber si un determinado factor ejerció influencia sobre una variable, tal como se puede evaluar con el análisis que proporciona ANOVA, sino que se necesitó conocer adicionalmente cuales son los grupos que presentaron diferencias, es decir se necesitó evaluar las diferencias entre los grupos experimentales de ratones para cada variable. Para ello se realizaron comparaciones múltiples entre los diferentes grupos experimentales, ya que la utilización repetida de una prueba t entre grupos es metodológicamente de dudosa corrección dado que puede ofrecer falsos positivos (Motulsky 2014). El procedimiento seguido fue utilizar el análisis de la varianza de una vía (ONEWAY ANOVA, SPSS), y dentro de este procedimiento, a su vez, emplear el análisis de Bonferroni para determinar dichas diferencias. En esencia este procedimiento es un

análisis de comparaciones múltiples que permite comparar las medias de los diferentes grupos experimentales para un factor en estudio, después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias en el análisis ONEWAY ANOVA. Además, se estudió la relación entre los diferentes parámetros y variables mediante el análisis de las correlaciones entre los mismos, segmentándose dichos análisis por los grupos correspondientes de los ratones experimentales. Se consideró que una correlación determinada fue significativa cuando $P < 0,05$, además se consignó el valor del coeficiente de correlación lineal de Pearson (R). Si bien P indica la significación de esa relación, o cuanto se podría confiar en que esa relación es real, R en su valor absoluto señala la intensidad de la asociación, y R^2 sería la proporción en la que se puede explicar por esa relación el modelo lineal dado. En los determinados casos en los que se comprobó la existencia de correlación y se pudo establecer una causalidad, además se realizó un análisis de regresión lineal, determinándose los correspondientes coeficientes especialmente la pendiente de la recta de regresión, así como (R y R^2).

5. RESULTADOS.

5.1 EXPOSICIÓN DE RESULTADOS

Se presentan los resultados a partir de las medias aritméticas de los diferentes subgrupos experimentales en función de los factores considerados (EDAD, TRATAMIENTO, DIETA). También se calculan y expresan las medias de los grupos de ratones agrupados o segmentados por los diferentes factores de acuerdo a las comparaciones que se realicen. En todo caso se tomó como referencia el grupo de ratones que en cada caso se consideró control. Así, las comparaciones se hicieron frente a estos grupos control: viejos frente a adultos, administrados con rhGH frente a controles salinos, o alimentados con la dieta del 20% frente al 14% de lactoalbúmina. Se expresaron las diferencias porcentualmente, como el porcentaje de la diferencia entre las medias que se consideraron en cada caso. Además se incorporaron los resultados de los análisis de la varianza (ANOVA) correspondiente y las comparaciones múltiples por el método de Bonferroni. Igualmente se exponen, en su caso los resultados de los análisis de regresión lineal. También se incorpora la comparación entre los grupos de ratones alimentados con las dietas de lactoalbúmina y los ratones alimentados con la dieta comercial control.

5.1.1. INGESTA TOTAL (IT), INGESTA PROTEICA (IP), PESO FINAL, GANANCIA DE PESO Y EFICACIA ALIMENTARIA

Edad

Con la edad avanzada disminuyeron (aproximadamente un 12%) las ingestas (Tabla 1) de forma significativa (Tabla 10), tanto la ingesta total como la cantidad de proteína ingerida diariamente (IT: adultos=128,16±3,15; viejos=112,36±1,91) (IP: adultos=21,66±0,88; viejos=19,16±0,87). El análisis de la varianza reflejó esa circunstancia de forma que se obtuvieron altas significaciones para las ingestas por

el factor EDAD (Tabla 10 ANOVA). No hubo efecto de la EDAD para peso final, ganancia, ni para la eficacia alimentaria (Tabla 11 ANOVA).

Tratamiento

En los ratones tratados con GH se encontró un considerable incremento en la ganancia de peso (295%) (Salinos: $1,04 \pm 0,42$; GH: $4,09 \pm 0,217$); ello les llevó a un aumento (14%) significativo del peso final (Tabla 2) (Salinos= $29,79 \pm 0,65$; GH= $33,88 \pm 0,58$). Ese incremento de peso lo consiguieron a través de una incrementada eficacia alimentaria (302%) (Salinos= $0,254 \pm 0,146$; GH= $1,021 \pm 0,108$), mientras que la administración de GH solo llevó a un pequeño incremento de la ingesta de la dieta (5%) que no fue significativo (Salinos= $116,74 \pm 2,56$; GH= $122,75 \pm 3,35$) (Tabla 1). En consecuencia, el análisis de la varianza señaló al TRATAMIENTO como un factor muy significativo para peso final, ganancia de peso y eficacia alimentaria (Tabla 11 ANOVA).

Diferencias entre grupos e Interacciones entre los factores

En la comparación de los diferentes grupos experimentales entre sí, sólo se observó una acción significativa debida al efecto de la edad avanzada; así los valores de la ingesta en los ratones viejos produjo una disminución del 24% en las ingestas total y proteica (IT: adultos 14% GH= $144,09 \pm 3,42$; viejos 14% GH= $109,30 \pm 3,31$; IP: adultos 14% GH= $20,17 \pm 0,48$; viejos 14% GH= $15,30 \pm 0,46$) frente a los controles adultos alimentados con la misma dieta y tratados con GH (Tabla 1). Sin embargo, mediante el análisis de la varianza por la que se agrupan los animales por factores sí se pudo comprobar un efecto del TRATAMIENTO cerca del límite de la

significación (0,031), así como una interacción EDADxTRATAMIENTO con una significación moderada (0,019) (Tabla 10 ANOVA).

En la comparación de los diversos grupos experimentales se pudieron observar diversos efectos debidos al tratamiento con GH. Así, por una parte llevó a un significativo incremento del 19% de la ingesta total (Tabla 1) en el grupo de los ratones adultos alimentados con la dieta del 14% (adultos 14% salinos: $120,62 \pm 4,34$; adultos 14% GH: $144,09 \pm 3,42$). Por otra parte, en los ratones viejos alimentados con la dieta del 20% de proteína, el tratamiento con GH indujo una ganancia de peso de un 281% respecto a los controles salinos (viejos 20% salinos: $1,19 \pm 0,50$; viejos 20% GH: $4,54 \pm 0,39$) (Tabla 2).

Los ratones alimentados con la dieta del 20% ingirieron significativamente más proteína (41%) que los alimentados con la dieta del 14% de proteína, dado el mayor contenido proteico de la dieta consumida (dieta 14% = $16,91 \pm 0,49$; dieta 20% = $23,79 \pm 0,52$) (Tabla 1). En el análisis de la varianza el factor DIETA resultó muy significativo (Tabla 10 ANOVA). Por lo que respecta a la ingesta proteica, en los distintos grupos de ratones, se observaron esos aumentos cuando se compararon aquellos alimentados con la dieta del 20% frente a los alimentados con la dieta del 14%, especialmente en los grupos de ratones tratados con GH; así aumentó la ingesta proteica (IP) en adultos tratados con GH en un 26 % (Adultos 14% GH = $20,17 \pm 0,48$; Adultos 20% GH = $25,42 \pm 0,77$) y un 43% en Adultos salinos (Adultos 14% salinos = $16,89 \pm 0,61$; Adultos 20% salinos = $24,17 \pm 1,44$). Mientras que en los ratones viejos los valores incrementaron un 50% en los tratados con GH

(Viejos 14% GH=15,30±0,46; Viejos 20% GH=22,96±0,81) y un 46% en los salinos (Viejos 14% salinos=15,61±0,58; Viejos 20% salinos=22,80±0,89) (Tabla 1).

La dieta con el 20% de proteína pareció comportarse como reductora de la ganancia de peso corporal, al menos entre los ratones adultos, ya que los ratones adultos salinos a los que se alimentó con esta dieta presentaron una disminución significativa de la ganancia de peso mientras que los adultos salinos alimentados con la dieta del 14% de proteína presentaron una ganancia positiva (adultos 14%=3,48±0,69; adultos 20%=-0,18±0,14) (Tabla 2). El análisis de la varianza ofreció interacciones significativas EDADxDIETA y EDADxTRATAMIENTOxDIETA para la ganancia de peso (Tabla 11 ANOVA). Mientras, en los ratones Viejos tratados con GH y alimentados con la dieta del 20% de proteína (Viejos 20% salinos=0,29±0,40; Viejos 20% GH=1,23±0,31), la eficacia alimentaria aumentó en un 324% frente a los controles salinos. También se pudo comprobar la interacción de los factores EDADxDIETA y EDADxTRATAMIENTOxDIETA para la eficacia alimentaria mediante el análisis de la varianza con una baja significación (Tabla 11 ANOVA).

Relaciones lineales entre INGESTA TOTAL, INGESTA PROTEICA TOTAL y GANANCIA DE PESO frente a PESO FINAL

En todos los grupos experimentales se encontró que el peso final del animal se relacionó significativamente tanto con la ganancia de peso ($R=0,608$ y $P<0,001$) como con la ingesta total ($R=0,372$ y $P=0,015$) (Gráfico 7) y la eficacia alimentaria ($R=0,506$ y $P=0,001$) (Gráfico 8). En los ratones adultos existió una relación significativa entre ingesta total y glucemia ($R=0,527$ y $P=0,021$) (Gráfico 9), lo que

señaló la relación entre cantidad de alimento ingerido y niveles plasmáticos de glucosa en la sangre de los animales, independientemente del tratamiento o de la dieta experimental a la que se somete al grupo de ratones.

Por otra parte, también se encontraron relaciones significativas entre el peso vacío y algunas variables como peso final ($R= 0,902$ y $P<0,001$), ganancia de peso ($R= 0,549$ y $P< 0,001$), así como la eficacia alimenticia ($R= 0,433$ y $P= 0,004$) (datos no mostrados en gráfica). Finalmente, la ganancia de peso se relacionó linealmente de forma positiva con la eficacia alimentaria ($R= 0,773$ y $P<0,001$). Se pudo observar como el tratamiento con GH proporcionó a estos animales una alta eficacia y por tanto una alta ganancia de peso, mientras que los ratones salinos mostraron un comportamiento más lineal en todo el rango de valores (Gráfico 10).

5.1.2 DEPÓSITOS DE GRASA CORPORALES Y GRASA CORPORAL

Edad

Con la edad aumentaron todos los depósitos grasos, tanto la grasa corporal residual (grasa corporal con exclusión de los depósitos específicos, que son extraídos previamente) (porcentual y absoluta), así como los depósitos de grasa específicos (abdominal, gonadal, conjunto de depósitos) (Tabla 3). El análisis de varianza ANOVA de dichas variables refleja claramente la influencia del factor EDAD, que resultó muy significativo (Tabla ANOVA 12). Respecto a los diferentes depósitos de grasa, el porcentaje de aumento en los ratones viejos comparados con los adultos fue de un 272% en la grasa abdominal (Adultos= $0,064\pm0,009$; Viejos= $0,238\pm0,037$), del 96% en la grasa gonadal (Adultos= $0,214\pm0,015$; Viejos= $0,419\pm0,032$), y del

166% de la suma de los diferentes depósitos en los Viejos frente a los Adultos (Adultos= $0,406\pm0,020$; Viejos= $1,082\pm0,092$). En su conjunto, sin tener en cuenta los depósitos grasos específicos, el depósito global de grasa corporal residual no resultó tan modificado, ya que solo aumentó un 5% de la grasa corporal en los Viejos (Adultos= $13,050\pm0,559$; Viejos= $13,750\pm0,475$), y un 8% en la grasa corporal residual (Adultos= $3,260\pm0,137$; Viejos= $3,520\pm0,153$), debido a la diferente evolución de los depósitos grasos corporales.

Tratamiento

El tratamiento con GH indujo una disminución de contenido de todos los depósitos grasos: 53% en la grasa abdominal (salino= $0,215\pm0,043$; GH= $0,101\pm0,015$), 27% en la grasa gonadal (salino= $0,375\pm0,045$; GH= $0,273\pm0,016$), y en la suma de todos los depósitos la disminución fue de un 35% (salino= $0,934\pm0,131$; GH= $0,603\pm0,050$) (Tabla 3). Por su parte, también se encontró una disminución paralela de la grasa corporal residual, aunque menor que la correspondiente a la de los depósitos grasos, del 13% (salino= $14,404\pm0,563$ y GH= $12,522\pm0,392$) en comparación con los ratones controles no tratados con la hormona (Tabla 3). En el análisis de la varianza se encontró que el TRATAMIENTO fue un factor con alta significación en todas las variables excepto en la grasa corporal residual para la que resultó no significativa (Tabla 12 ANOVA).

Dieta

La ingesta de la dieta con mayor contenido proteico (20%) llevó a un aumento significativo tanto de la grasa abdominal en un 108% (dieta 14%= $0,101\pm0,011$;

dieta 20%=0,210±0,043), como de la suma de los depósitos grasos en un 43% (dieta 14%=0,626±0,066; dieta 20%=0,895±0,122) en los ratones experimentales (Tabla 3).

Diferencias entre grupos e Interacciones entre los factores

El tratamiento con GH hizo disminuir la grasa porcentual un 29% en los ratones adultos que fueron alimentados con la dieta del 14% de contenido proteico frente a los controles salinos (adultos 14% salinos 16,21±1,02 y adultos 14% GH 11,57±0,40) (Tabla 3). Por otra parte, los ratones viejos tratados con GH y alimentados con la dieta del 20% de proteína presentaron un incremento de la grasa abdominal de un 140% respecto a los controles alimentados con dieta del 14% (viejos 14% GH=0,088±0,008; viejos 20% GH= 0,211±0,014) (Tabla 3). En el grupo de los ratones viejos salinos alimentados con la dieta del 20% se observan aumentos de los depósitos grasos abdominal y gonadal, así como del conjunto de los depósitos grasos, con unos valores porcentuales de un 241% (abdominal, Viejos 14% salinos=0,157±0,018; Viejos 20% salinos=0,535±0,020), el 63% (gonadal, Viejos 14% salinos=0,407±0,021; Viejos 20% salinos=0,665±0,038), y el 77% (suma de depósitos, Viejos 14% salinos=1,02±0,09; Viejos 20% salinos=1,81±0,09).

Los ratones viejos alimentados con la dieta alta en proteína (20%) presentaron un aumento significativo de los depósitos grasos frente a los adultos, ello se reflejó en la presencia de una interacción EDADxDIETA (Tabla 12 ANOVA). Sin embargo, el tratamiento con GH indujo en los ratones viejos una disminución de los depósitos grasos frente a los controles salinos, abdominal (60%) (viejos 20% salinos=0,535±0,020; viejos 20% GH=0,211±0,014), gonadal (48%) (viejos 20%

salinos= $0,665 \pm 0,038$; viejos 20% GH= $0,345 \pm 0,016$), y del 53% en la suma de todos los depósitos grasos (viejos 20% salinos= $1,81 \pm 0,09$; viejos 20% GH= $0,85 \pm 0,02$) (Tabla 3). Además, también se observaron interacciones entre la EDAD y el TRATAMIENTO (interacciones entre la EDAD y el TRATAMIENTO así como entre la EDAD el TRATAMIENTO y la DIETA Tabla 12 ANOVA). Así, en la comparación de los depósitos grasos entre los ratones viejos frente a los adultos salinos alimentados con la dieta del 20% se puede observar como en los primeros se produjo un aumento de un 1038% en el depósito de grasa abdominal (adultos 20% salinos $0,047 \pm 0,012$ y viejos 20% salinos $0,535 \pm 0,020$), y de un 321% en el depósito de grasa gonadal (adultos 20% salinos $0,158 \pm 0,017$ y viejos 20% salinos $0,665 \pm 0,038$) con relación a los adultos (Tabla 3). Cuando a esos animales se les administró GH (ratones viejos tratados con GH y alimentados con el 20% de proteína) se produjo un menor incremento de la grasa abdominal que fue solo del 331% (adultos 20% GH $0,049 \pm 0,010$ y viejos 20% GH $0,211 \pm 0,014$) y de un 113% en la grasa gonadal (adultos 20% GH $0,162 \pm 0,007$ y viejos 20% GH $0,345 \pm 0,016$) con respecto a los adultos (Tabla 3).

Comparación con controles de dieta

La administración de las dietas experimentales conteniendo lactoalbúmina supuso un incremento sustancial del contenido graso de la grasa corporal de los grupos experimentales adultos frente a los controles alimentados con la dieta comercial, aunque únicamente fue significativo frente al grupo adultos 14% salinos (ANOVA de una vía, Gráficos 1a y 1b). Mientras que en los depósitos corporales de grasa no hubo diferencias apreciables entre controles adultos y grupos de adultos, en el caso de

controles viejos y los diferentes grupos de ratones viejos alimentados con lactoalbúmina el comportamiento fue muy diferente. Así, estos presentaron valores superiores a los salinos y tratados con GH alimentados con el 14% solamente para la grasa abdominal, e inferiores a los salinos alimentados con el 20% para la grasa abdominal, gonadal y suma de grasas (ANOVA de una vía, Gráfico 1c y 1d).

Relaciones lineales de GRASAS CON PESO FINAL

Existió una relación significativa entre grasa corporal residual y el peso corporal final que se mantuvo tanto en el conjunto de los grupos de ratones ($R=0,420$ y $P=0,006$) (Gráfico 11), como en los diferentes subgrupos experimentales. Además, todos los depósitos grasos estuvieron relacionados entre ellos, en diferente grado en los diferentes subgrupos. Así, en general, se relacionaron la grasa abdominal con grasa gonadal ($R=0,890$ y $P<0,001$), y con grasa corporal residual ($R=0,341$ y $P=0,027$) (datos no mostrados en gráfica). También la grasa gonadal se relacionó significativamente con la grasa corporal residual ($R=0,386$ y $P=0,012$) (datos no mostrados en gráfica).

En relación con los niveles sanguíneos de hormonas, o de sustratos metabólicos, se encontró que la grasa corporal residual estaba relacionada con los niveles de glucemia en los animales no tratados ($R=0,571$ y $P=0,011$) y en los tratados con GH ($R=-0,467$ y $P=0,028$) (Gráficos 12 a y b, respectivamente).

5.1.3 MÚSCULOS SOLEO, BICEPS, CUADRICEPS Y GASTROCNEMIO

Edad

Los ratones viejos presentaron un aumento (26%) significativo del peso del bíceps (adultos $0,257 \pm 0,009$ y viejos $0,325 \pm 0,014$) y así como una pequeña disminución (3%) del peso del gastrocnemio (adultos $0,090 \pm 0,002$ y viejos $0,087 \pm 0,003$) (Tabla 4). El análisis de la varianza mostró que el factor EDAD fue muy significativo para todas las variables del peso muscular (Tabla 13 ANOVA).

Tratamiento

El tratamiento con GH indujo en los ratones un incremento del 14% en el peso del cuádriceps (salino $0,322 \pm 0,012$ y GH $0,366 \pm 0,010$) y del 17% en el peso del gastrocnemio (salino $0,081 \pm 0,002$ y GH $0,095 \pm 0,004$) (Tabla 4). El factor TRATAMIENTO resultó significativo en el análisis de la varianza para los pesos musculares de cuádriceps y gastrocnemio pero no para los otros músculos (Tabla 13 ANOVA).

No se hallaron más efectos ni interacciones en los análisis de la varianza de los pesos musculares (Tabla 13 ANOVA).

Comparación con controles de dieta

La administración de las dietas experimentales conteniendo lactoalbúmina no supuso modificación sustancial de los pesos musculares, se pudo observar, en todo caso, una tendencia a mayores valores en la suma de los pesos musculares de los

adultos alimentados con la dieta comercial frente a los grupos alimentados con las dietas con lactoalbúmina y una disminución de la misma variable en los controles viejos alimentados con la dieta comercial frente a los grupos experimentales (ANOVA de una vía, Gráfico 2a).

Relaciones lineales entre los pesos de los diferentes MÚSCULOS CON el PESO FINAL

El conjunto de los músculos considerados en este estudio guardaron una relación lineal con el peso corporal en los diferentes grupos de ratones ($R=0,439$ y $P=0,004$) (Gráfico 14). Por separado también se relacionaron con el peso corporal de forma directa y muy significativa tanto el gastrocnemio ($R=0,640$ y $P<0,001$) como el cuádriceps ($R=0,398$ y $P=0,009$). Además, se encontraron relaciones entre bíceps y soleo ($R=0,469$ y $P=0,002$) y entre cuádriceps y gastrocnemio ($R=0,331$ y $P=0,032$) (datos no mostrados en gráficas).

5.1.4 PROTEÍNA CORPORAL ABSOLUTA Y PORCENTUAL Y RELACIÓN PROTEÍNA CORPORAL/GRASA CORPORAL

Edad

Con la vejez disminuyeron significativamente los valores del contenido proteico corporal con unos porcentajes de disminución que fueron del 6% en la cantidad de proteína corporal (adultos $4,612\pm0,127$ y viejos $4,352\pm0,089$), y del 7% en el porcentaje proteico (adultos $18,344\pm0,173$ y viejos $17,096\pm0,209$) (Tabla 5). Previamente se ha señalado que con la edad se produjo un aumento significativo de

la grasa corporal; por lo tanto, dadas ambas modificaciones, de la grasa y de la proteína corporal, condujeron a una disminución significativa del 12% de la relación proteína/grasa (adultos $1,457 \pm 0,065$ y viejos $1,284 \pm 0,059$), en comparación con los controles adultos (Tabla 5). En el análisis de la varianza apareció el factor EDAD como muy significativo para las variables (Tabla 14 ANOVA).

Tratamiento

El tratamiento con GH indujo un aumento significativo de un 16% en el valor de proteína corporal (salinos $4,127 \pm 0,079$ y GH $4,793 \pm 0,087$), un 4% en el porcentaje de proteína corporal, que no resultó significativo (salinos $17,360 \pm 0,291$ y GH $17,991 \pm 0,157$), y un 17% en la relación proteína/grasa (salinos $1,254 \pm 0,069$ y GH $1,470 \pm 0,052$) (Tabla 5). Ello se reflejó en el análisis de la varianza donde se pudo comprobar como el TRATAMIENTO apareció como factor muy significativo para todas las variables (Tabla 14 ANOVA).

Diferencias entre grupos e Interacciones entre los factores

En los ratones viejos salinos alimentados con la dieta del 20%, la disminución en el contenido porcentual de proteína corporal frente a sus controles adultos fue de un 14% (adultos 20% salinos $18,54 \pm 0,50$ y viejos 20% salinos $16,00 \pm 0,57$). Mientras que ese efecto no se produjo en los ratones alimentados con la dieta del 14%. Por otra parte, en los ratones adultos tratados con GH y alimentados con la dieta del 14% el aumento de proteína corporal fue de un 25% frente a sus controles (adultos 14% salinos $4,21 \pm 0,10$ y adultos 14% GH $5,26 \pm 0,10$). Se pudo comprobar la aparición de

una interacción significativa EDADxTRATAMIENTOxDIETA en el análisis de la varianza correspondiente (Tabla 14 ANOVA).

Comparación con controles de dieta

La administración de las dietas experimentales conteniendo lactoalbúmina no supuso modificación significativa de la proteína corporal porcentual, pero sí se pudo comprobar una diferencia en la cantidad de proteína corporal absoluta en los grupos de ratones viejos tratados con GH frente al grupo de control alimentado con dieta comercial, que también fue diferente del grupo control adulto (ANOVA de una vía, Gráficos 2c y 2d). Por su parte, la razón proteína/grasa resultó especialmente sensible a las modificaciones de la grasa corporal indicadas previamente para los grupos de ratones alimentados con dieta comercial frente a los grupos alimentados con las dietas conteniendo lactoalbúmina especialmente con el aumento de la grasa en los adultos controles frente a los grupos experimentales, no así los viejos. Por ello, también se comprobó una diferencia significativa entre ambos grupos de dieta control, adultos y viejos (ANOVA de una vía, Gráfico 2e).

Comparación con controles de dieta del peso corporal vacío

La administración de las dietas experimentales conteniendo lactoalbúmina supuso un incremento significativo del peso corporal vacío únicamente de los grupos de ratones viejos tratados con GH en comparación los controles alimentados con la dieta comercial (ANOVA de una vía, Gráfico 2b).

Relaciones lineales de PROTEÍNA, CENIZAS, HUMEDAD Y RELACIÓN PROTEÍNA/GRASA CON PESO FINAL

En el conjunto de los ratones el peso final se relacionó con el contenido proteico corporal ($R=0,810$ y $P<0,001$) (Gráfico 14), cenizas ($R=0,315$ y $P=0,043$) y humedad ($R=0,871$ y $P<0,001$) (datos no mostrados). Las relaciones se mantuvieron significativas en los diferentes subgrupos de ratones (tratamiento, la edad o la dieta).

La razón proteína/grasa se relacionó significativamente con la glucemia ($R=-0,578$ y $P=0,010$) en los ratones que no han sido sometidos a tratamiento hormonal (salinos) (Gráfico 15a). Sorprendentemente existió una relación inversa a la anterior cuando se consideraron los grupos de ratones tratados entre el cociente proteína/grasa y los valores de glucemia ($R=0,449$ y $P=0,036$) (Gráfico 15b).

5.1.5 HÍGADO, CORAZÓN y COLON

Edad

Con la edad disminuyeron significativamente los pesos del hígado y del corazón (Tabla 6) con un porcentaje de disminución del 11% en ambos casos (hígado: adultos $1,680\pm0,099$, viejos $1,492\pm0,048$; corazón: adultos $0,253\pm0,014$, viejos $0,226\pm0,010$). Por el contrario, el colon presentó un aumento significativo del 18% (colon adultos $0,210\pm0,010$ y colon viejos $0,249\pm0,013$). El efecto significativo de la EDAD se vio reflejado en los análisis de la varianza correspondientes (Tabla 15 ANOVA).

Tratamiento

El tratamiento indujo un incremento significativo del peso del hígado (24%: salino $1,403 \pm 0,049$ y GH $1,744 \pm 0,081$) y del peso del corazón (15%: salino $0,221 \pm 0,014$ y GH $0,255 \pm 0,010$) (Tabla 6). Consecuentemente, el análisis de la varianza mostró que el factor TRATAMIENTO fue muy significativo en su influencia sobre estas variables, pero no sobre el peso del colon, que resultó ser no significativo (Tabla 15 ANOVA).

Dieta

Por otra parte, los ratones alimentados con la dieta del 20% presentaron una disminución significativa (Tabla 6) del 18% en el peso del corazón (dieta 14% $0,263 \pm 0,013$ y dieta 20% $0,215 \pm 0,010$). En consecuencia, el análisis de la varianza en el caso del peso del corazón señaló a la DIETA como factor muy significativo, pero la dieta no ejerció ese efecto global sobre el peso del hígado ni sobre el peso del colon, que resultaron no significativos por DIETA (Tabla 15 ANOVA).

Diferencias entre grupos e Interacciones entre los factores

Los ratones viejos tratados con GH y alimentados con la dieta del 20% de proteína presentaron un incremento en el peso del corazón del 41% frente a los controles salinos (viejos 20% salinos $0,188 \pm 0,012$ y viejos 20% GH $0,265 \pm 0,021$).

Los ratones adultos tratados con GH y alimentados con la dieta del 14% presentaron un aumento del 62% en el peso del hígado respecto a los salinos (adultos 14% salinos $1,328 \pm 0,042$ y adultos 14% GH $2,148 \pm 0,102$).

Los ratones viejos tratados con GH y alimentados con la dieta del 14% de proteína presentaron una disminución en el peso del hígado del 26% frente a los controles adultos (adultos 14% GH $2,148 \pm 0,102$ y viejos 14% GH $1,582 \pm 0,089$).

Los ratones adultos salinos alimentados con la dieta del 14% presentaron una disminución del 39% en el peso del corazón frente a los pesos de los viejos (adultos 14% salinos $0,323 \pm 0,015$ y viejos 14% salinos $0,198 \pm 0,011$).

El corazón de los ratones adultos alimentados con la dieta del 20%, tratados y no tratados con GH, presentaron unas disminuciones del 25% (adultos 14% GH $0,292 \pm 0,022$ y adultos 20% GH $0,220 \pm 0,010$) y del 45% (adultos 14% salinos $0,323 \pm 0,015$ y adultos 20% salinos $0,178 \pm 0,005$), respectivamente.

Comparación con controles de dieta

La administración de las dietas experimentales conteniendo lactoalbúmina presentó diferente comportamiento en los diferentes órganos en estudio. Así, se pudo comprobar como los ratones controles adultos presentaron pesos inferiores de hígado frente a adultos 14% tratados con GH (ANOVA de una vía, Gráfico 2a). En el caso del corazón los ratones controles adultos presentaron pesos menores a los de los adultos alimentados con el 14% tanto tratados con GH como salinos, y los valores del peso del corazón de los controles viejos fueron significativamente inferiores a los de los ratones viejos tratados con GH de ambas dietas con lactoalbúmina (ANOVA de una vía, Gráfico 2b). Por otra parte, para los valores del peso del colon, el resultado fue bastante diferente ya que mientras que en los adultos no hubo diferencias significativas con el grupo control de dieta comercial, el grupo control de

ratones viejos presentó un peso significativamente superior a los correspondientes grupos de ratones viejos de las dietas experimentales, consecuentemente también se pudo comprobar mayor peso de colon en los animales viejos control frente a los controles adultos (ANOVA de una vía, Gráfico 2c).

Relaciones lineales entre CORAZÓN, HÍGADO Y COLON con el PESO FINAL

Se encontraron relaciones lineales significativas entre los diferentes órganos y el peso final del ratón. Así, entre peso final con el peso del corazón ($R=0,454$ y $P=0,003$), pero no se mantuvo una relación general con el peso del colon (Gráfico 16). También se estableció una relación lineal significativa entre peso final y peso del hígado ($R=0,805$ y $P<0,001$) (Gráfico 17). Se pudo observar en los gráficos el solapamiento de los diferentes grupos experimentales, si pero mayores valores de peso final y de hígado para algunos animales tratados con GH. Eso mismo se podría decir cuando se segmentó el análisis por edades siendo en este caso los valores superiores para los adultos (Gráfico 17).

En los ratones adultos sí se observó una relación entre peso final con peso del hígado ($R=0,820$ y $P<0,001$) y también con el peso del colon ($R=0,673$ y $P=0,001$). A su vez, tanto el peso del corazón ($R=0,481$ y $P=0,032$) y peso del hígado ($R=0,663$ y $P=0,001$) se observó que están relacionados significativamente con el peso del colon. Por otra parte, apareció una correlación significativa entre peso del colon y los valores de glucemia en ratones viejos ($R=0,633$ y $P=0,002$) y en ratones salinos ($R=0,486$ y $P=0,035$) (datos no mostrados gráficamente).

5.1.6 COLESTEROL, TG, HDL, GLUCEMIA, ÍNDICE ATEROGÉNICO, IGF-1 Y LEPTINA

Edad

Los ratones viejos presentaron disminuciones significativas del 37% en los valores de los triglicéridos (TG) (adultos: $1,878 \pm 0,147$; viejos: $1,180 \pm 0,044$) y del 12% en los valores de la lipoproteína HDL-colesterol (HDL) (adultos: $1,252 \pm 0,056$; viejos: $1,098 \pm 0,028$) (Tabla 7). Por el contrario, estos ratones viejos mostraron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de leptina del 92% (Tabla 8) (adultos: $2,287 \pm 0,319$; viejos: $4,404 \pm 0,712$) (Tabla 7). En paralelo con la vejez también aumentó el índice aterogénico (IA) un 15% de forma significativa (adultos: $4,260 \pm 0,165$; viejos: $4,901 \pm 0,147$) (Tabla 7). El efecto de la EDAD se correspondió en la aparición de significaciones altas en los análisis de la varianza correspondientes para las variables de TG, HDL e IA así como para leptina, pero no para colesterol total, ni para la glucemia, ni tampoco para los valores de IGF-1 (Tablas 16 y 17 ANOVA).

En los ratones viejos tratados con GH y alimentados con la dieta del 20% se obtuvieron mayores descensos que los encontrados globalmente en los niveles de TG y de HDL. En estos últimos las disminuciones frente a los controles fueron, respectivamente, del 57% (adultos: 20% GH $2,88 \pm 0,11$; viejos: 20% GH $1,24 \pm 0,10$) y del 30% (adultos: 20% GH $1,59 \pm 0,07$; viejos: 20% GH $1,12 \pm 0,05$).

Tratamiento

El tratamiento con GH indujo en los ratones experimentales (Tabla 7) aumentos significativos de los niveles plasmáticos del colesterol total en un 13% (salinos: $5,032 \pm 0,217$; GH: $5,683 \pm 0,180$), de los triglicéridos con un aumento que fue del 37% (salinos: $1,268 \pm 0,058$; GH: $1,739 \pm 0,151$), y también de las lipoproteínas HDL en un 14% (salinos: $1,090 \pm 0,029$; GH: $1,245 \pm 0,052$). Se constató la influencia del efecto del tratamiento hormonal en los respectivos análisis de la varianza ya que en todos los casos el factor TRATAMIENTO fue muy significativo (Tabla 16 ANOVA); por el contrario, el índice aterogénico pareció no verse afectado por dicho factor.

Dieta

Por su parte, la dieta con el contenido del 20% en proteína llevó al incremento de los valores de los triglicéridos en un 20% (dieta 14% $1,376 \pm 0,076$, dieta 20% $1,659 \pm 0,161$), de las HDL en un 12% (dieta 14% $1,104 \pm 0,031$, dieta 20% $1,238 \pm 0,054$) (Tabla 7), y de la leptina en un 98% (dieta 14% $2,279 \pm 0,306$ y dieta 20% $4,512 \pm 0,737$) (Tabla 8). El análisis de la varianza lo reflejó y aparecieron en estas variables el factor DIETA como muy significativo; sin embargo, no lo fue para el colesterol total ni para el índice aterogénico, como tampoco para la glucemia, ni para los niveles de IGF-1 (Tablas 16 y 17 ANOVA).

Los ratones viejos salinos y alimentados con la dieta del 20% de proteína, presentaron unos valores superiores (30%) de la concentración de IGF-1 (viejos 14% salinos $838,16 \pm 32,94$ y viejos 20% salinos $1092,47 \pm 14,20$).

Los animales adultos salinos alimentados con el 20% de proteína presentaron una disminución del 80% en los valores de la concentración de leptina respecto a los ratones controles alimentados con el 14% de proteína (adultos 14% salinos $4,36 \pm 0,34$ y adultos 20% salinos $0,85 \pm 0,04$) (Tabla 8). Por otra parte, tanto los ratones viejos tratados con GH como los salinos alimentados con la dieta del 20%, presentaron en comparación con los que se alimentaron con la dieta del 14% de proteína, respectivamente unos incrementos del 305% (viejos 14% salinos $1,68 \pm 0,20$ y viejos 20% salinos $6,80 \pm 0,20$) y del 845% (viejos 14% GH $0,87 \pm 0,07$ y viejos 20% GH $8,22 \pm 0,41$) (Tabla 8). Este comportamiento se reflejó en la aparición de la correspondiente interacción significativa EDADxDIETA (Tabla 17 ANOVA).

Diferencias entre grupos e Interacciones entre los factores

Se observó la existencia de una interacción con la realización del análisis de la varianza EDADxTRATAMIENTO (Tabla 16 ANOVA) dado el aumento (49%) de los valores de colesterol dentro del grupo de ratones viejos salinos alimentados con la dieta del 20% de proteína frente a los adultos (adultos: 20% salinos $3,96 \pm 0,24$, viejos 20% salinos $5,91 \pm 0,23$); mientras que, por el contrario, en los animales tratados con GH lo que se obtuvo fue precisamente una disminución del 22% (adultos 20% GH $6,81 \pm 0,26$ y viejos 20% GH $5,28 \pm 0,21$).

En el caso de los ratones viejos, tanto salinos como tratados con GH, alimentados con la dieta del 14% de proteína, los niveles de leptina disminuyeron un 61% y un 65%, respectivamente (adultos: 14% salinos $4,36 \pm 0,34$, viejos 14% salinos $1,68 \pm 0,20$; adultos 14% GH $2,49 \pm 0,16$, viejos 14% GH $0,87 \pm 0,07$). Por el contrario, cuando los animales consumieron la dieta del 20% se produjo una inversión de la

tendencia y los valores de las concentraciones de leptina se incrementaron con la edad en los ratones salinos y tratados con GH, en un 700% y un 467%, respectivamente (adultos 20% salinos $0,85 \pm 0,04$ y viejos 20% salinos $6,80 \pm 0,20$; adultos 20% GH $1,45 \pm 0,11$ y viejos 20% GH $8,22 \pm 0,41$).

Los ratones adultos tratados con GH y alimentados con la dieta del 20% de proteína, en comparación con los alimentados con la dieta del 14% de proteína, presentaron mayores valores de los niveles de triglicéridos (56%: adultos 14% GH $1,84 \pm 0,08$ y adultos 20% GH $2,88 \pm 0,11$) y de lipoproteínas HDL (25%: adulto 14% GH $1,27 \pm 0,06$ y adulto 20% GH $1,59 \pm 0,07$) (Tabla 7).

El tratamiento con GH indujo en los animales experimentales adultos un incremento de los niveles de colesterol, que fue de un 25% en los alimentados con la dieta del 14% y del 72% en los fueron alimentados con la dieta del 20% de proteína (adultos 14% salinos $4,71 \pm 0,28$ y adultos 14% GH $5,87 \pm 0,24$; adultos 20% salinos $3,96 \pm 0,24$ y adultos 20% GH $6,81 \pm 0,26$) (Tabla 7). En paralelo, en los niveles de triglicéridos, se obtuvo una respuesta similar con un aumento del 34% en los ratones alimentados con la dieta del 14% de proteína (adultos 14% salinos $1,37 \pm 0,09$ y adultos 14% GH $1,84 \pm 0,08$) y un aumento del 103% en los que consumieron la dieta del 20% de proteína (adultos 20% salinos $1,42 \pm 0,12$ y adultos 20% GH $2,88 \pm 0,11$) (Tabla 7). Las interacciones TRATAMIENTOxDIETA quedaron señaladas en el análisis de la varianza con alta significación (Tabla 16 ANOVA).

El tratamiento con GH llevó a los ratones adultos alimentados con la dieta del 20% de proteína a un aumento (47%) significativo en los valores de HDL (adultos 20% salinos $1,08 \pm 0,07$ y adultos 20% GH $1,59 \pm 0,07$) (Tabla 7).

El tratamiento con GH indujo una disminución (43%) de los niveles de leptina en los ratones adultos alimentados con la dieta del 14% de proteína frente a sus controles salinos (adultos 14% salinos $4,36 \pm 0,34$ y adultos 14% GH $2,49 \pm 0,16$) (Tabla 8). Por el contrario, ese tratamiento con GH, en los ratones viejos alimentados con la dieta del 20% les llevó a que incrementaran en un 21% sus niveles de leptina frente a sus controles salinos (viejos 20% salinos $6,80 \pm 0,20$ y viejos 20% GH $8,22 \pm 0,41$) (Tabla 8).

Comparación con controles de dieta

La administración de las dietas experimentales conteniendo lactoalbúmina supuso un incremento significativo de la concentración del colesterol total y del índice aterogénico de los grupos experimentales frente a los controles alimentados con la dieta comercial, tanto adultos como viejos (ANOVA de una vía, Gráficos 4a y 4d). Se pudo comprobar que los triglicéridos de los adultos mostraron valores superiores a los controles alimentados con la dieta comercial, con una tendencia similar a la expuesta para el colesterol pero en este caso solo para los adultos, así como una diferencia entre los grupos control adulto y viejo (ANOVA de una vía, Gráfico 4b). Por lo que respecta al HDL-colesterol los valores de los controles fueron similares a los diferentes grupos de ratones alimentados con lactoalbúmina, solamente los grupos adultos 20% GH, viejos 14% salinos y viejos 14% GH fueron respectivamente mayor y menores a los grupos controles (ANOVA de una vía, Gráfico 4c).

Por otra parte en relación a los niveles de glucemia, aunque los valores tuvieron una tendencia a ser ligeramente inferiores en los grupos de control alimentados con las dietas comerciales no fueron significativamente diferentes (ANOVA de una vía,

Gráfico 5a). En relación a la leptina se obtuvieron resultados muy diferentes en los grupos control alimentados con la dieta comercial y también muy diferentes a los grupos de las dietas experimentales sin que pareciera existir un patrón que explicara esas diferencias (ANOVA de una vía, Gráfico 5b). No llegaron a ser muy diferentes globalmente las concentraciones de IGF-1 entre los grupos alimentados con lactoalbúmina y los controles alimentados con dieta comercial, solamente se constató la diferencia significativa del grupo adultos 14% GH, y por otra parte de los grupos de viejos alimentados con el 20% tratados con GH y salinos (ANOVA de una vía, Gráfico 5c).

5.1.7 LIPOPEROXIDACIÓN HEPÁTICA (LPO) y MUERTE CELULAR HEPÁTICA

Edad

Los ratones experimentales viejos presentaron unos niveles incrementados de lipoperoxidación hepática (LPO) (14%) (adultos: $307,7 \pm 9,7$, viejos: $349,8 \pm 19,8$), así como de la muerte celular de los hepatocitos (81%) (adultos: $5,08 \pm 0,76$; viejos: $9,19 \pm 0,77$) (Tabla 9). El marcado efecto de la EDAD se pudo comprobar en el análisis de la varianza en estas variables con alta significación para este factor (Tabla 18 ANOVA).

Tratamiento

Por el contrario, el tratamiento con GH llevó a una disminución de la LPO del 26% (salinos $379,51 \pm 15,35$ y GH $281,38 \pm 8,59$) (Tabla 9). Sin embargo, el tratamiento con

la hormona GH incrementó significativamente el índice de muerte celular un 106% (salinos $4,65 \pm 0,65$ y GH $9,59 \pm 0,73$) (Tabla 9). También el TRATAMIENTO fue un factor de alta significación en el análisis de la varianza y como tal se manifestó en el mismo para estas variables (Tabla 18 ANOVA).

Edad

Los ratones viejos salinos alimentados con la dieta del 14% de proteína mostraron un aumento de la LPO del 35% (adultos 14% salinos $346,32 \pm 13,38$ y viejos 14% salinos $467,61 \pm 24,30$); así como de la muerte celular del 247% (adultos 14% salinos $239,52 \pm 40,77$ y viejos 14% salinos $820,32 \pm 166,18$) (Tabla 9).

Tratamiento

En el grupo de ratones viejos tratados con GH y alimentados con la dieta del 20% de proteína se incrementaron la muerte celular en un 114% (adultos 20% GH $616,32 \pm 103,76$ y viejos 20% GH $1317,36 \pm 61,51$) (Tabla 9).

En el grupo de adultos tratados con GH alimentados con el 14% se observó un aumento de un aumento de la muerte celular del 257% (adultos 14% salinos $2,47 \pm 0,48$ y adultos 14% GH $8,81 \pm 1,70$) (Tabla 9).

Las disminuciones en los valores de LPO en los ratones viejos tratados con GH y alimentados con la dieta del 14% de proteína fue del 40% (viejos 14% salinos $467,61 \pm 24,30$ y viejos 14% GH $278,20 \pm 14,64$) (Tabla 9).

En el grupo de ratones viejos tratados con GH y alimentados con la dieta del 20% de proteína se produjo una disminución de la LPO del 26% (viejos 20% salinos

384,61±20,27 y viejos 20% GH 282,98±22,73). El aumento de la muerte celular fue del 139% (viejos 20% salinos 5,27±0,35 y viejos 20% GH 12,58±0,46) (Tabla 9).

5.1.8 ACTIVIDAD PARAOXONASA (PON1) y RAZÓN PON1:HDL

Edad

Con la edad avanzada de los ratones se produjo un aumento considerable de los valores de PON1 y de la razón PON1:HDL (Tabla 8), de forma que los ratones viejos que fueron alimentados con las dietas experimentales que contenían lactoalbúmina, presentaron un incremento en el valor medio del 86% sobre los adultos (adultos 35,178±4,798 y viejos 65,392±3,532) y del 126% en la razón PON1:HDL (adultos 26,62±2,79 y viejos 60,92±3,97) (Tabla 8). En el análisis de la varianza el factor EDAD apareció muy significativo en ambas variables (Tabla 17 ANOVA).

Tratamiento

Los ratones tratados con GH presentaron un incremento del 56% en el valor de PON1 (salinos 39,454±6,252 y GH 61,504±2,989), y un incremento del 38% en el valor de la razón PON1:HDL (salinos 37,17±6,37 y GH 51,33±3,31) (Tabla 8). El porcentaje de aumento para PON1 en el caso de los ratones viejos tratados con GH y sometidos a la dieta del 14%, fue de un 63% (adultos 14% GH 39,60±2,01 y viejos 14% GH 64,61±2,52) (Tabla 8). En el análisis de la varianza también el factor TRATAMIENTO apareció muy significativo en ambas variables (Tabla 17 ANOVA).

Diferencias entre grupos e Interacciones entre los factores

En el grupo de los ratones viejos salinos y alimentados con la dieta del 14% de proteína, mostraron un aumento de PON1 de un 374% (adultos 14% salinos $17,52 \pm 1,03$ y viejos 14% salinos $83,00 \pm 2,74$). Por el contrario, los ratones viejos salinos alimentados con la dieta del 20% presentaron un incremento del 144% (adultos 20% salinos $16,65 \pm 1,37$ y viejos 20% salinos $40,65 \pm 2,78$) respecto a los ratones adultos. Es decir, que se encontró una interacción significativa DIETAxEDAD como quedó de manifiesto también en el análisis de la varianza (Tabla 17 ANOVA).

El porcentaje de aumento en el caso de los ratones viejos tratados con GH y sometidos a la dieta del 14% de proteína, fue de un 63% frente a los adultos (adultos 14% GH $39,60 \pm 2,01$ y viejos 14% GH $64,61 \pm 2,52$).

En el caso de los ratones adultos el tratamiento con GH indujo un incremento de los valores de PON1 sobre los animales salinos del 126% cuando la dieta administrada fue la del 14% de proteína (adultos 14% salinos $17,52 \pm 1,03$ y adultos 14% GH $39,60 \pm 2,01$) y del 302% cuando la dieta ingerida por los animales fue la del 20% de proteína (adultos 20% salinos $16,65 \pm 1,37$ y adultos 20% GH $66,94 \pm 3,10$) (Tabla 8). Es decir, que en los ratones adultos, el consumo de una dieta con un mayor porcentaje de proteína en la dieta llevo a un mayor incremento del efecto del tratamiento hormonal con GH sobre el nivel de PON1 expresado. Por otra parte, mediante el tratamiento con GH en los ratones viejos llevó a una respuesta diferencial en el valor de PON1 dependiendo de la dieta suministrada. Así los alimentados con el 20% mostraron un aumento del 77% (viejos 20% salinos $40,65 \pm 2,78$ y viejos 20% GH $72,12 \pm 3,58$); mientras que si la dieta recibida fue la del

14% ello condujo a los ratones a una disminución del 22% en el valor medio de PON1 (viejos 14% salinos $83,00 \pm 2,74$ y viejos 14% GH $64,61 \pm 2,52$). Lo que indicó la existencia de una interacción significativa EDADxTRATAMIENTOxDIETA tal como se halló por el análisis de la varianza (Tabla 17 ANOVA).

Comparación con controles de dieta

La administración de las dietas experimentales conteniendo lactoalbúmina supuso diferencias significativas en los valores de la actividad de PON1 y de la razón PON1:HDL frente a los grupos alimentados con las dietas comerciales, tanto en los grupos de adultos (valores menores en los salinos y mayores en los tratados con GH) como en los viejos (valores mayores), únicamente resultó no significativo el grupo adultos 14% GH en el caso de la razón PON1:HDL (ANOVA de una vía, Gráficos 7a y 7b).

Relaciones lineales entre COLESTEROL, TG, HDL, PON1, LEPTINA, MUERTE CELULAR, LPO, ÍNDICE ATEROGÉNICO CON PESO FINAL

Considerados en conjunto los ratones de todos los grupos experimentales, se encontró una relación significativa positiva entre HDL y el peso final ($R=0,382$ y $P=0,012$) (Gráfico 18); mientras que la relación entre LPO y peso final fue negativa ($R=-0,474$ y $P=0,002$) (Gráfico 19).

Por otra parte, los niveles plasmáticos de colesterol fueron relacionados con las concentraciones plasmáticas de TG y HDL ($R=0,491$ y $P=0,001$; $R=0,591$ y $P<0,001$, respectivamente), así como con el IA ($R=0,435$ y $P=0,004$). A su vez los niveles de TG se relacionaron con los de HDL ($R=0,690$ y $P<0,001$). Además, se encontró

también una correlación significativa entre IA y muerte celular hepática ($R=0,414$ y $P=0,007$).

Se encontraron relaciones significativas entre muerte celular con PON1 (Gráfica 20), de la LPO con el peso vacío de los animales ($R=-0,361$ y $P=0,021$) (Gráfico 21), con el peso final ($P=-0,474$ y $P=0,002$), con la ganancia de peso ($R=-0,644$ y $P<0,001$), y con la eficacia alimentaria ($R=-0,523$ y $P<0,001$).

RESULTADOS.

5.2 TABLAS

Tabla 1. Ingesta diaria, ingesta total e ingesta proteica total en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	Ingesta diaria (g/d)	Ingesta total (g)	Ingesta proteica total (g)
Adulto 14% s	4,02 ± 0,14 [*]	120,62 ± 4,34 [*]	16,89 ± 0,61 ⁺
Adulto 20% s	4,03 ± 0,24	120,83 ± 7,19	24,17 ± 1,44 ⁺
Adulto 14% GH	4,80 ± 0,11 ^{*&}	144,09 ± 3,42 ^{*&}	20,17 ± 0,48 ^{+&}
Adulto 20% GH	4,24 ± 0,13	127,09 ± 3,84	25,42 ± 0,77 ⁺
Viejo 14% s	3,72 ± 0,14	111,50 ± 4,16	15,61 ± 0,58 ⁺
Viejo 20% s	3,80 ± 0,15	113,98 ± 4,47	22,80 ± 0,89 ⁺
Viejo 14% GH	3,64 ± 0,11 ^{&}	109,30 ± 3,31 ^{&}	15,30 ± 0,46 ^{+&}
Viejo 20% GH	3,83 ± 0,14	114,80 ± 4,07	22,96 ± 0,81 ⁺

(n= 6, media ± error estándar de la media).

Superíndices: + indica diferencias significativas debidas a la dieta

*indica diferencias significativas debidas al tratamiento

& indica diferencias significativas debidas a la edad

Tabla 2. Peso inicial, peso final, ganancia de peso, eficacia alimentaria en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	Peso inicial (g)		Peso final (g)		Ganancia de peso (g/d)		Eficacia alimentaria (g/g)	
Adulto 14% s	27,57 ±	1,34	31,05±	0,76	3,48 ±	0,69 ^{+&}	0,87 ±	0,28
Adulto 20% s	29,28 ±	0,78	29,10±	0,74	-0,18 ±	0,14 ⁺ *	-0,05 ±	0,04
Adulto 14% GH	32,53 ±	0,70	36,34±	0,51	4,01 ±	0,42	0,78 ±	0,21
Adulto 20% GH	30,32 ±	1,33	33,83±	1,82	3,51 ±	0,53 [*]	0,84 ±	0,14
Viejo 14% s	28,41 ±	1,71	28,07±	1,47	-0,35 ±	0,54 ^{*&}	-0,09 ±	0,15
Viejo 20% s	29,76 ±	1,51	30,95±	1,77	1,19 ±	0,50 [*]	0,29 ±	0,40
Viejo 14% GH	28,80 ±	1,13	33,01±	0,91	4,21 ±	0,41 [*]	1,16 ±	0,11
Viejo 20% GH	28,21 ±	1,25	32,75±	0,82	4,54 ±	0,39 [*]	1,23 ±	0,31

(n= 6, media ± error estándar de la media).

Superíndices: + indica diferencias significativas debidas a la dieta

*indica diferencias significativas debidas al tratamiento

& indica diferencias significativas debidas a la edad

Tabla 3. Grasa corporal residual, grasa corporal, grasa abdominal, grasa gonadal y suma de depósitos grasos en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	Grasa corporal residual (g)	Grasa corporal (%)	Grasa abdominal (g)	Grasa gonadal (g)	Suma depósitos grasos (g)
Adulto 14% s	3,88 ± 0,29	16,21 ± 1,02*	0,122 ± 0,015	0,273 ± 0,032	0,39 ± 0,03 ^{&}
Adulto 20% s	2,84 ± 0,16	12,47 ± 0,96	0,047 ± 0,012 ^{&}	0,158 ± 0,017 ^{&}	0,51 ± 0,03 ^{&}
Adulto 14% GH	3,25 ± 0,19	11,57 ± 0,40*	0,042 ± 0,012	0,266 ± 0,010	0,31 ± 0,01 ^{&}
Adulto 20% GH	3,08 ± 0,27	11,96 ± 0,64	0,049 ± 0,010 ^{&}	0,162 ± 0,007 ^{&}	0,42 ± 0,02 ^{&}
Viejo 14% s	3,18 ± 0,34	13,39 ± 1,08	0,157 ± 0,018 ⁺	0,407 ± 0,021	1,02 ± 0,09 ⁺ ^{&}
Viejo 20% s	3,91 ± 0,31	15,56 ± 0,75	0,535 ± 0,020 ^{++&}	0,665 ± 0,038 ^{*&}	1,81 ± 0,09 ^{++&}
Viejo 14% GH	3,55 ± 0,34	13,31 ± 1,07	0,088 ± 0,008 ⁺	0,299 ± 0,023	0,75 ± 0,03 ^{&}
Viejo 20% GH	3,45 ± 0,24	12,99 ± 0,68	0,211 ± 0,014 ^{++&}	0,345 ± 0,016 ^{*&}	0,85 ± 0,02 ^{*&}

(n= 6, media ± error estándar de la media).

Superíndices: + indica diferencias significativas debidas a la dieta

*indica diferencias significativas debidas al tratamiento

& indica diferencias significativas debidas a la edad

Tabla 4. Pesos de soleo, bíceps, cuádriceps, gastrocnemio y suma de pesos musculares en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	Soleo (g)	Bíceps (g)	Cuádriceps (g)	Gastrocnemio (g)	Suma de pesos musculares (g)
Adulto 14% s	0,062 ± 0,003	0,248 ± 0,021	0,310 ± 0,023	0,084 ± 0,004	0,704 ± 0,031
Adulto 20% s	0,062 ± 0,006	0,243 ± 0,016	0,331 ± 0,037	0,081 ± 0,004	0,716 ± 0,053
Adulto 14% GH	0,055 ± 0,005	0,282 ± 0,017	0,359 ± 0,005	0,096 ± 0,006	0,792 ± 0,020
Adulto 20% GH	0,050 ± 0,004	0,256 ± 0,023	0,387 ± 0,028	0,099 ± 0,004	0,792 ± 0,034
Viejo 14% s	0,060 ± 0,007	0,317 ± 0,041	0,333 ± 0,027	0,076 ± 0,005	0,785 ± 0,072
Viejo 20% s	0,060 ± 0,005	0,355 ± 0,033	0,316 ± 0,012	0,087 ± 0,005	0,818 ± 0,041
Viejo 14% GH	0,063 ± 0,006	0,332 ± 0,015	0,322 ± 0,016	0,093 ± 0,008	0,810 ± 0,033
Viejo 20% GH	0,051 ± 0,003	0,300 ± 0,029	0,399 ± 0,018	0,093 ± 0,012	0,843 ± 0,037

(n= 6, media ± error estándar de la media).

Superíndices: + indica diferencias significativas debidas a la dieta

*indica diferencias significativas debidas al tratamiento

& indica diferencias significativas debidas a la edad

Tabla 5. Peso corporal vacío, proteína corporal absoluta, proteína corporal porcentual y relación proteína/grasa corporal en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	Peso corporal vacío (g)	Proteína corporal absoluta (g)	Proteína corporal porcentual (%)	Proteína/grasa corporal (g/g)
Adulto 14% s	23,863 ± 0,481*	4,21 ± 0,10*	17,64 ± 0,35	1,11 ± 0,09
Adulto 20% s	22,930 ± 0,499	4,26 ± 0,20	18,54 ± 0,50&	1,53 ± 0,14
Adulto 14% GH	28,017 ± 0,668*	5,26 ± 0,10*	18,77 ± 0,08	1,63 ± 0,06
Adulto 20% GH	25,625 ± 1,279	4,73 ± 0,26	18,43 ± 0,10	1,56 ± 0,08
Viejo 14% s	23,560 ± 1,200	4,05 ± 0,14	17,26 ± 0,31	1,33 ± 0,14
Viejo 20% s	24,029 ± 1,291	3,99 ± 0,20	16,00 ± 0,57&	1,05 ± 0,09
Viejo 14% GH	26,515 ± 0,506	4,63 ± 0,06	17,48 ± 0,32	1,37 ± 0,13
Viejo 20% GH	26,474 ± 0,783	4,63 ± 0,12	17,49 ± 0,18	1,37 ± 0,08

(n= 6, media ± error estándar de la media).

Superíndices: + indica diferencias significativas debidas a la dieta

*indica diferencias significativas debidas al tratamiento

& indica diferencias significativas debidas a la edad

Tabla 6. Pesos de hígado, corazón y colon en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	Hígado (g)	Corazón (g)	Colon (g)
Adulto 14% s	1,328 ± 0,042 [*]	0,323 ± 0,015 ^{+&}	0,201 ± 0,022
Adulto 20% s	1,444 ± 0,102	0,178 ± 0,005 ⁺	0,164 ± 0,002
Adulto 14% GH	2,148 ± 0,102 ^{*&}	0,292 ± 0,022 ⁺	0,252 ± 0,020
Adulto 20% GH	1,803 ± 0,252	0,220 ± 0,010 ⁺	0,225 ± 0,018
Viejo 14% s	1,349 ± 0,119	0,198 ± 0,011 ^{&}	0,303 ± 0,036
Viejo 20% s	1,495 ± 0,125	0,188 ± 0,012 [*]	0,245 ± 0,024
Viejo 14% GH	1,582 ± 0,089 ^{&}	0,245 ± 0,021	0,214 ± 0,016
Viejo 20% GH	1,523 ± 0,050	0,265 ± 0,021 [*]	0,245 ± 0,021

(n= 6, media ± error estándar de la media).

Superíndices: + indica diferencias significativas debidas a la dieta

*indica diferencias significativas debidas al tratamiento

& indica diferencias significativas debidas a la edad

Tabla 7. Valores de colesterol total, triglicéridos, HDL colesterol e índice aterogénico en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	Colesterol total (mM/L)	Triglicéridos (mM/L)	HDL (mM/L)	Índice aterogénico
Adulto 14% s	4,71 ± 0,28*	1,37 ± 0,09*	1,06 ± 0,03	4,34 ± 0,11
Adulto 20% s	3,96 ± 0,24*&	1,42 ± 0,12*	1,08 ± 0,07*	3,71 ± 0,30
Adulto 14% GH	5,87 ± 0,24*	1,84 ± 0,08 ^{++&}	1,27 ± 0,06*	4,66 ± 0,42
Adulto 20% GH	6,81 ± 0,26*&	2,88 ± 0,11 ^{++&}	1,59 ± 0,07 ^{++&}	4,33 ± 0,35
Viejo 14% s	5,68 ± 0,22	1,07 ± 0,13	1,03 ± 0,05	5,29 ± 0,19
Viejo 20% s	5,91 ± 0,23&	1,18 ± 0,09	1,19 ± 0,07	4,84 ± 0,26
Viejo 14% GH	4,99 ± 0,16	1,20 ± 0,05&	1,06 ± 0,05	4,77 ± 0,41
Viejo 20% GH	5,28 ± 0,21&	1,24 ± 0,10&	1,12 ± 0,05&	4,76 ± 0,26

(n= 6, media ± error estándar de la media).

Superíndices: + indica diferencias significativas debidas a la dieta

*indica diferencias significativas debidas al tratamiento

& indica diferencias significativas debidas a la edad

Tabla 8. Valores de concentraciones hemáticas de glucosa, leptina, IGF-I, PON1 y PON1: HDL en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	Glucosa (mg/dL)		Leptina (ng/mL)		IGF-I (ng/mL)		PON1 (U/L)		PON1:HDL	
Adulto 14% s	72	± 11	4,36	± 0,34 ^{++&}	916,89	± 44,84	17.52	± 1.03 ^{*&}	16,68	± 1,51 ^{*&}
Adulto 20% s	67	± 12	0,85	± 0,04 ^{++&}	918,54	± 45,32	16.65	± 1.37 ^{*&}	15,72	± 1,68 ^{*&}
Adulto 14% GH	82	± 9	2,49	± 0,16 ^{*&}	1062,09	± 62,00	39.60	± 2.01 ^{++&}	31,57	± 2,83 ^{++&}
Adulto 20% GH	66	± 13	1,45	± 0,11 ^{&}	930,38	± 61,91	66.94	± 3.10 ^{++&}	42,51	± 3,41 ^{++&}
Viejo 14% s	80	± 12	1,68	± 0,20 ^{++&}	838,16	± 32,94 ⁺	83.00	± 2.74 ^{++&}	81,57	± 5,37 ^{++&}
Viejo 20% s	73	± 7	6,80	± 0,20 ^{++&}	1092,47	± 14,20 ⁺	40.65	± 2.78 ^{++&}	34,71	± 3,22 ^{++&}
Viejo 14% GH	65	± 9	0,87	± 0,07 ^{++&}	905,55	± 48,14	64.61	± 2.52 ^{++&}	61,59	± 3,38 ^{*&}
Viejo 20% GH	81	± 6	8,22	± 0,41 ^{++&}	1009,78	± 42,44	72.12	± 3.58 ^{++&}	64,88	± 2,92 ^{*&}

(n= 6, media ± error estándar de la media).

Superíndices: + indica diferencias significativas debidas a la dieta

*indica diferencias significativas debidas al tratamiento

& indica diferencias significativas debidas a la edad

Tabla 9. Valores de lipoperoxidación y muerte celular hepática en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados y tratados, sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	LPO (nmol/mg prot)		Muerte celular (U/mg prot)	
Adulto 14% s	346,32±	13,38 ^{&}	2,47 ±	0,48 ^{*&}
Adulto 20% s	319,48±	13,21	2,87 ±	0,14
Adulto 14% GH	277,37±	18,72	8,81 ±	1,70 [*]
Adulto 20% GH	287,63±	18,59	6,17 ±	1,04 ^{&}
Viejo 14% s	467,61±	24,30 ^{*&}	7,99 ±	1,65 ^{&}
Viejo 20% s	384,61±	20,27 [*]	5,27 ±	0,35 [*]
Viejo 14% GH	278,20±	14,64 [*]	10,63±	0,94
Viejo 20% GH	282,98±	22,73 [*]	12,58±	0,46 ^{*&}

(n= 6, media ± error estándar de la media).

Superíndices: + indica diferencias significativas debidas a la dieta

*indica diferencias significativas debidas al tratamiento

& indica diferencias significativas debidas a la edad

Tabla 10. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre la Ingesta diaria (g), ingesta total (g) e ingesta proteica (g) en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina

	Ingesta diaria	Ingesta total (g)	Ingesta proteica (g)
EDAD (E)	0,000	0,000	0,000
TRATAMIENTO (T)	0,031	0,031	NS
DIETA (D)	NS	NS	0,000
ExT	0,019	0,019	0,047
ExD	NS	NS	NS
TxD	NS	NS	NS
ExTxD	NS	NS	NS

NS (No Significativo, $p > 0,05$)

Tabla 11. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre peso final, ganancia de peso y eficacia alimentaria en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGh y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	Peso final		Ganancia de peso		Eficacia alimentaria
EDAD (E)	NS		NS		NS
TRATAMIENTO (T)	0,000		0,000		0,000
DIETA (D)	NS		NS		NS
ExT	NS		0,009		0,045
ExD	0,041		0,000		0,043
TxD	NS		NS		NS
ExTxD	NS		0,002		0,048

NS (No Significativo, $p > 0,05$)

Tabla 12. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre composición grasa y depósitos grasos corporales en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados y tratados, sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina. En la columna denominada *post hoc* situada a la derecha de una variable dada, se incluye el análisis de la comparación múltiple (Bonferroni) entre los diferentes grupos de ratones del factor analizado (EDAD, TRATAMIENTO o DIETA).

	Grasa corporal residual	Post hoc	Grasa	Post hoc
EDAD (E)	0,012	A≠CA	0,000	A≠CA
TRATAMIENTO (T)	NS	control≠GH control≠s	0,003	s≠GH; control≠s
DIETA (D)	NS	0≠14; 0≠20	NS	0≠14
ExT	NS		NS	
ExD	0,018		0,042	
TxD	NS		NS	
ExTxD	0,028		0,011	

	Grasa abdominal	Post hoc	Grasa gonadal	Post hoc	Suma de depósitos grasos	Post hoc
EDAD (E)	0,000	A≠V	0,000	A≠V; V≠CV	0,000	A≠V; CV≠CA
TRATAMIENTO (T)	0,000	s≠GH; GH≠control	0,000	s≠GH; control≠s	0,000	s≠GH
DIETA (D)	0,000	0≠14; 14≠20	NS	0≠20	0,000	14≠20
ExT	0,000		0,000		0,000	
ExD	0,000		0,000		0,003	
TxD	0,002		0,027		0,002	
ExTxD	0,000		0,016		0,002	

NS (No Significativo, $p > 0,05$)

Post hoc:

Ratones alimentados con dietas con lactoalbúmina frente

A:adulto, V:viejo, s: control salino, GH: tratados con rhGH, 14: alimentados con 14%, 20: alimentados con 20%

Ratones alimentados con dieta control comercial

DIETA=0

TRATAMIENTO=control

EDAD: CA: adulto control, CV: Viejo control

Tabla 13. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre los pesos de los músculos en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados y tratados, sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20%.

	Soleo	Post hoc	Biceps	Post hoc
EDAD (E)	0,049	A≠ CA	0,000	A≠ V; V≠CV
TRATAMIENTO (T)	NS	s≠control; GH≠control	NS	s≠control; GH≠control
DIETA (D)	NS	0≠14; 0≠20	NS	0≠14; 0≠20
ExT	NS		NS	
ExD	NS		NS	
TxD	NS		NS	
ExTxD	NS		NS	

	Cuadriceps	Post hoc	Gastrocnemio	Post hoc	Suma de Músculos	Post hoc
EDAD (E)	0,021		0,004	A≠CA; V≠CV	0,000	V≠ CV; V≠CV; CA≠CV
TRATAMIENTO (T)	0,014	s≠GH	0,000	s≠GH≠control	NS	
DIETA (D)	NS		NS	0≠14; 0≠20	NS	
ExT	NS		NS		NS	
ExD	NS		NS		NS	
TxD	NS		NS		NS	
ExTxD	NS		NS		NS	

NS (No Significativo, $p > 0,05$)

Post hoc:

Ratones alimentados con dietas con lactoalbúmina frente

A:adulto, V:viejo, s: control salino, GH: tratados con rhGH, 14: alimentados con 14%, 20: alimentados con 20%

Ratones alimentados con dieta control comercial

DIETA=0

TRATAMIENTO=control

EDAD: CA: adulto control, CV: Viejo control

Tabla 14. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre el peso corporal vacío, proteína (g), proteína (%) y razón proteína/grasa en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas

	Peso corporal vacío	Post hoc	Proteína (g)	Post hoc	Proteína (%)	Post hoc	Proteína/grasa	Post hoc
EDAD (E)	0,021	V≠CV	0,000	V≠CV	0,000	A≠V	0,000	A≠CA
TRATAMIENTO (T)	0,000	s≠GH; GH≠control	0,000	s≠control; GH≠s	0,005	s≠GH	0,006	s≠control; GH≠s
DIETA (D)	NS	0≠14; 0≠20	NS	0≠14; 0≠20	NS		NS	0≠14; 0≠20
ExT	NS		NS		NS		NS	
ExD	0,043		NS		NS		NS	
TxD	NS		NS		NS		NS	
ExTxD	NS		0,023		0,009		0,018	

NS (No Significativo, $p > 0,05$)

Post hoc:

Ratones alimentados con dietas con lactoalbúmina frente

A:adulto, V:viejo, s: control salino, GH: tratados con rhGH, 14: alimentados con 14%, 20: alimentados con 20%

Ratones alimentados con dieta control comercial

DIETA=0

TRATAMIENTO=control

EDAD: CA: adulto control, CV: Viejo control

Tabla 15. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre el peso del hígado, corazón y colon en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	Hígado	Post hoc	Corazón	Post hoc	Colon	Post hoc
EDAD (E)	0,009	V≠CV	0,005	A≠CA; V≠CV	0,000	A≠ CA; V≠CV
TRATAMIENTO (T)	0,000	s≠GH; GH≠control	0,001	s≠GH≠control	NS	s≠control; GH≠control
DIETA (D)	NS	0≠14; 0≠20	0,000	0≠14≠20	NS	0≠14; 0≠20
ExT	0,003		0,007		0,014	
ExD	NS		0,000		NS	
TxD	0,029		0,012		NS	
ExTxD	NS		NS		NS	

NS (No Significativo, $p > 0,05$)

Post hoc:

Ratones alimentados con dietas con lactoalbúmina frente

A:adulto, V:viejo, s: control salino, GH: tratados con rhGH, 14: alimentados con 14%, 20: alimentados con 20%

Ratones alimentados con dieta control comercial

DIETA=0

TRATAMIENTO=control

EDAD: CA :adulto control, CV : Viejo control

Tabla 16. Análisis de la varianza (ANOVA) Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre el colesterol, triglicéridos, HDL e índice aterogénico en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina

	Colesterol total	Post hoc	Triglicéridos	Post hoc	HDL	Post hoc	Índice aterogénico	Post hoc
EDAD (E)	NS	A≠CA; V≠CV	0,000	A≠V;A ≠CA	0,001	A≠ V	0,003	A≠ V; A≠CA; V≠CV
TRATAMIENTO (T)	0,000	s≠GH≠ control	0,000	s≠GH; control≠GH	0,000	s≠GH	NS	s≠control; GH≠control
DIETA (D)	NS	0≠14; 14≠20	0,000	0≠14≠20	0,003	14≠20	NS	0≠14; 14≠20
ExT	0,000		0,000		0,000		NS	
ExD	NS		0,001		NS		NS	
TxD	0,008		0,001		NS		NS	
ExTxD	0,013		0,000		0,028		NS	

NS (No Significativo, $p > 0,05$)

Post hoc:

Ratones alimentados con dietas con lactoalbúmina frente

A:adulto, V:viejo, s: control salino, GH: tratados con rhGH, 14: alimentados con 14%, 20: alimentados con 20%

Ratones alimentados con dieta control comercial

DIETA=0

TRATAMIENTO=control

EDAD: CA :adulto control, CV: Viejo control

Tabla 17. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre glucosa, leptina, IGF-1, PON1 y PON1: HDL en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

	Glucosa		Leptina	Post hoc	IGF	Post hoc
EDAD (E)	NS		0,000	A≠V	NS	A≠CA; V≠CV
TRATAMIENTO (T)	NS		NS		NS	control≠GH; control≠s
DIETA (D)	NS		0,000	0≠14≠20	NS	0≠14; 0≠20
ExT	NS		0,004		NS	
ExD	NS		0,000		0,001	
TxD	NS		0,000		0,044	
ExTxD	NS		NS		NS	

	PON1	Post hoc	PON1:HDL	Post hoc
EDAD (E)	0,000	A≠V	0,000	A≠V; V≠CV
TRATAMIENTO (T)	0,000	s≠GH; control≠GH	0,000	s≠GH ≠control
DIETA (D)	NS	0≠14 0≠20	0,001	20≠14 ≠0
ExT	0,000		0,002	
ExD	0,000		0,000	
TxD	0,000		0,000	
ExTxD	0,004		0,000	

NS (No Significativo, $p > 0,05$)

Post hoc:

Ratones alimentados con dietas con lactoalbúmina frente

A: adulto, V: viejo, s: control salino, GH: tratados con rhGH, 14: alimentados con 14%, 20: alimentados con 20%

Ratones alimentados con dieta control comercial

DIETA=0

TRATAMIENTO=control

EDAD: CA: adulto control, CV: Viejo control

Tabla 18. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, así como de sus interacciones sobre LPO y muerte celular en ratones BALB/c adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas de 14% y 20% de lactoalbúmina.

		LPO		Muerte celular
EDAD (E)		0,001		0,000
TRATAMIENTO (T)		0,000		0,000
DIETA (D)		NS		NS
ExT		0,001		NS
ExD		NS		NS
TxD		0,023		NS
ExTxD		NS		0,011

NS (No Significativo, $p > 0,05$)

RESULTADOS.

5.3 GRÁFICOS

Gráfico 1: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c , adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) grasa corporal residual, b) grasa corporal porcentual, c) grasa abdominal, d) grasa gonadal, e) suma de depósitos grasos.

Las diferencias significativas en el grupo control se marcan encima de la columna correspondiente con los símbolos:

* diferencia con control adulto, + diferencia con control viejo, & diferencias entre grupos controles

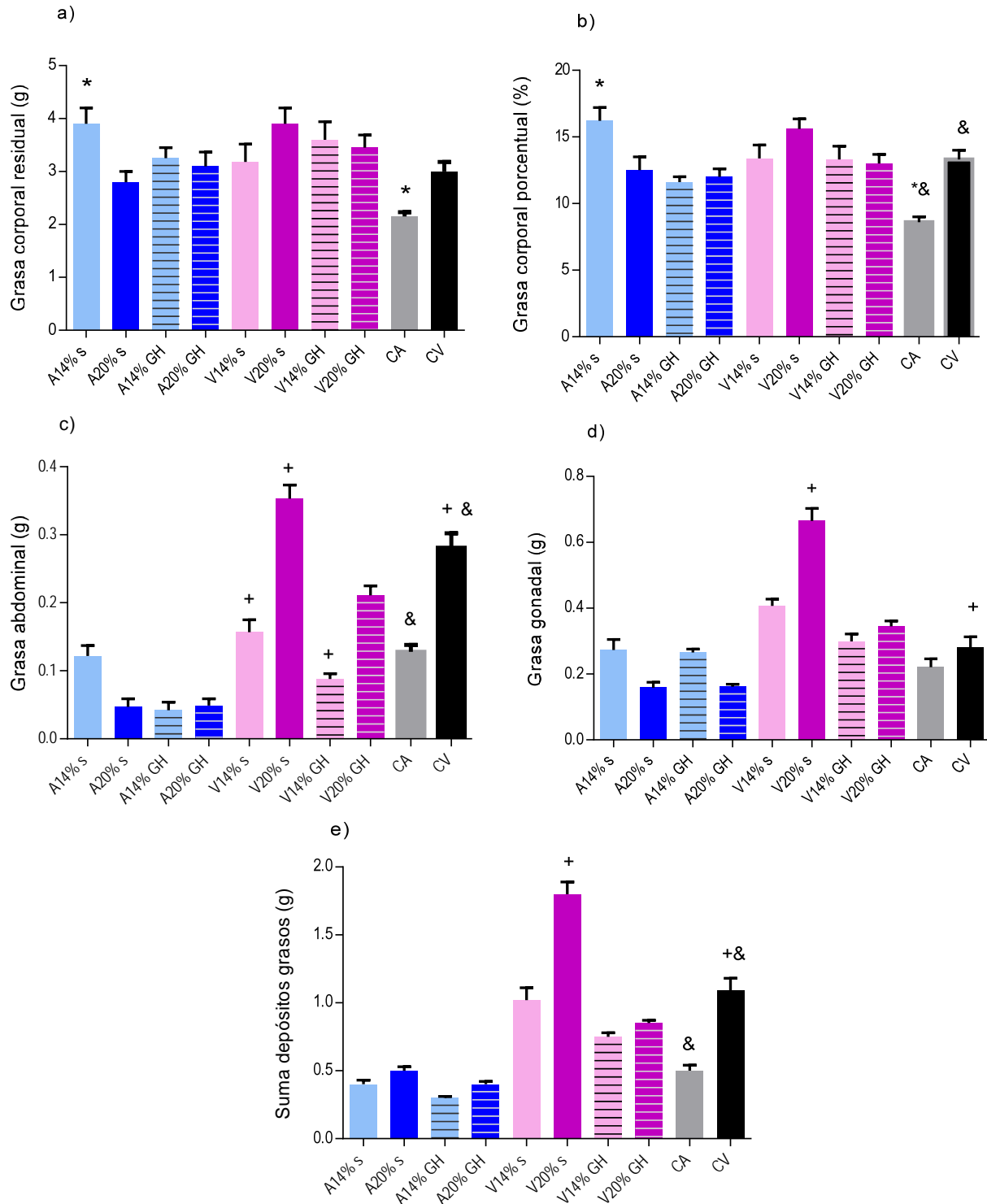


Gráfico 2: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) suma de músculos, b) peso corporal vacío, c) proteína corporal, d) proteína corporal porcentual, e) razón proteína/grasa.

Las diferencias significativas en el grupo control se marcan encima de la columna correspondiente con los símbolos:

* diferencia con control adulto, + diferencia con control viejo, & diferencias entre grupos controles

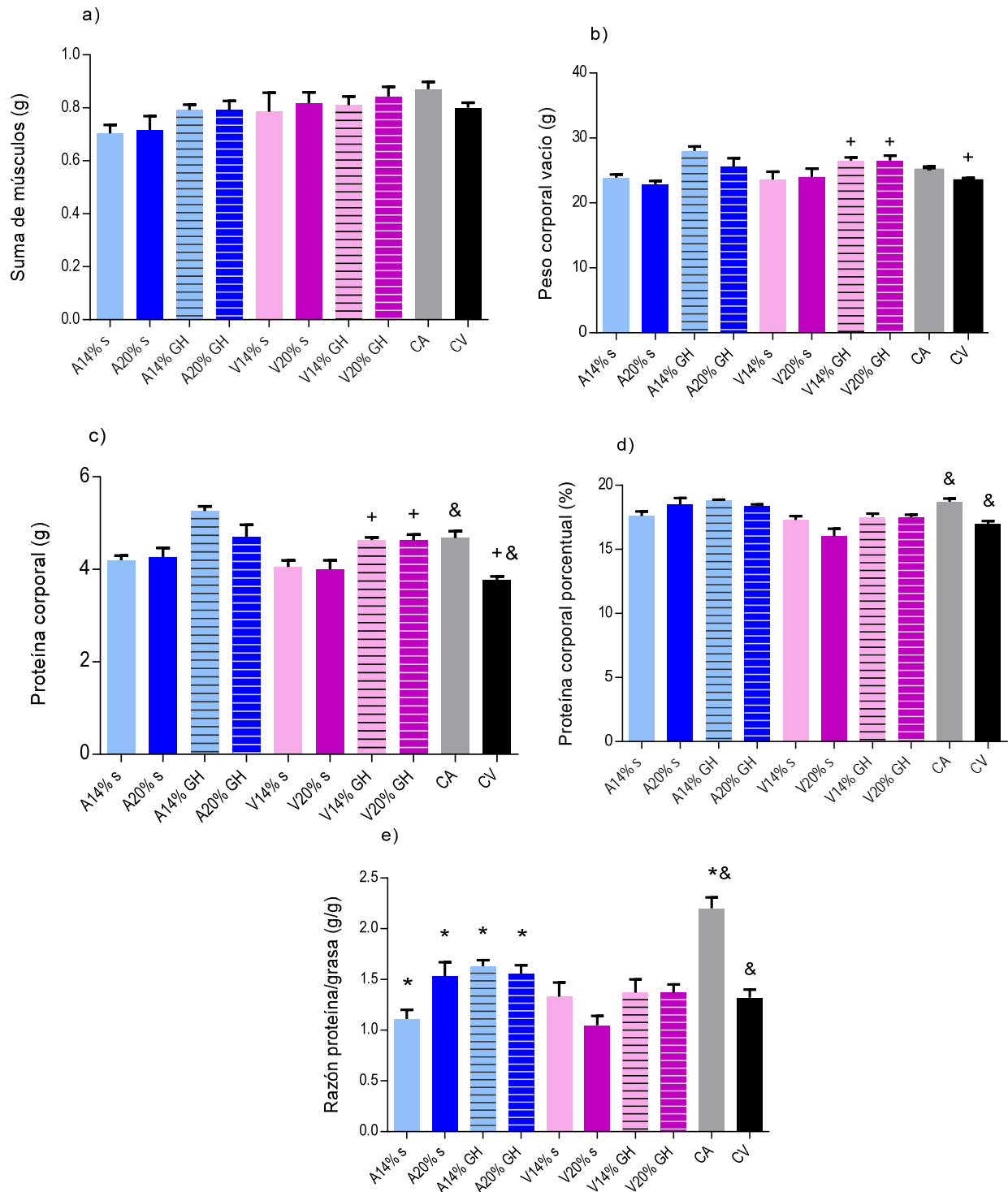


Gráfico 3: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c , adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) peso hígado, b) peso corazón, c) peso colon.

Las diferencias significativas en el grupo control se marcan encima de la columna correspondiente con los símbolos:
 * diferencia con control adulto, + diferencia con control viejo, & diferencias entre grupos controles

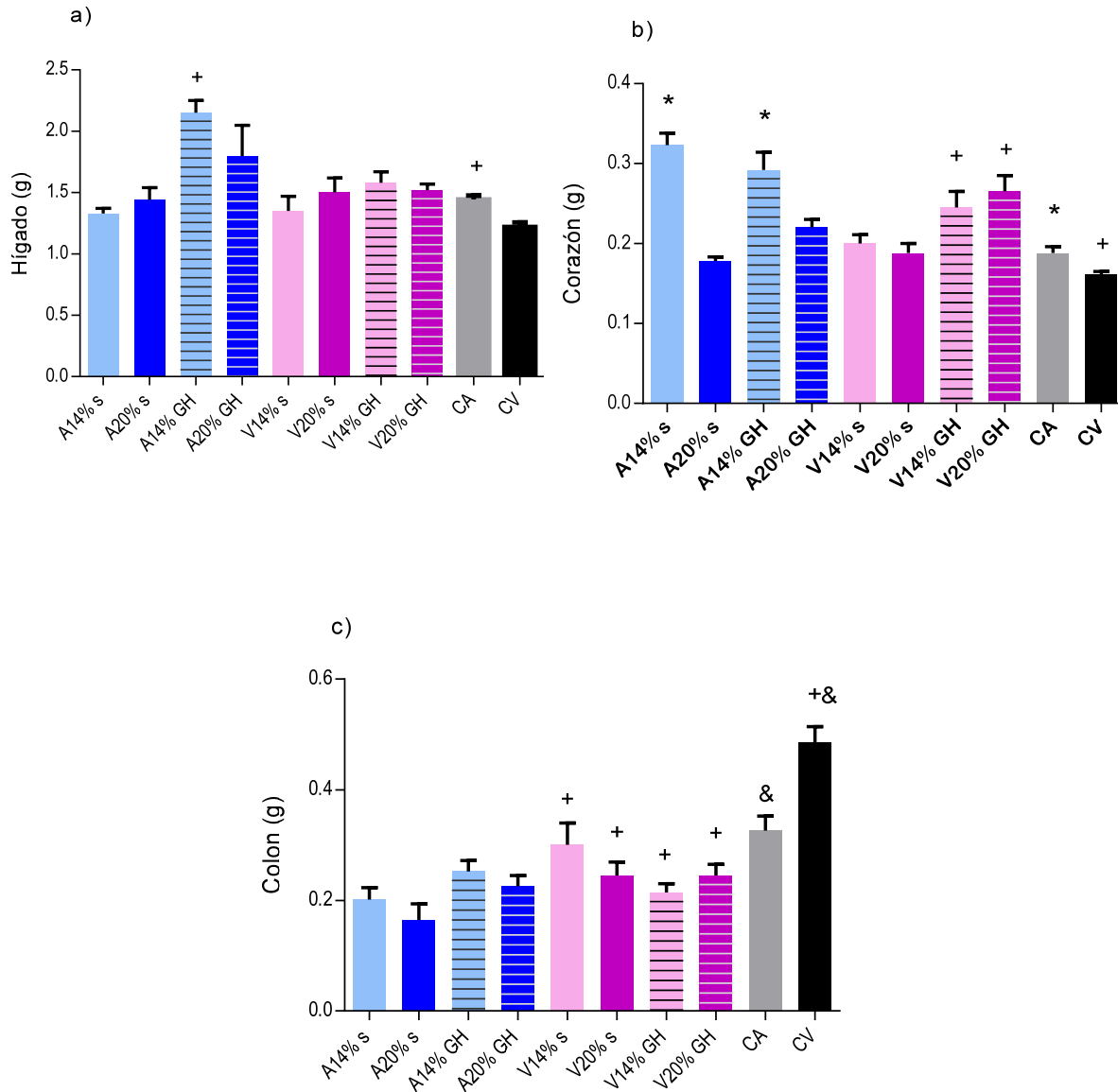


Gráfico 4: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) colesterol, b) triglicéridos, c) HDL-colesterol, d) índice aterogénico.

Las diferencias significativas en el grupo control se marcan encima de la columna correspondiente con los símbolos:

* diferencia con control adulto, + diferencia con control viejo, & diferencias entre grupos controles

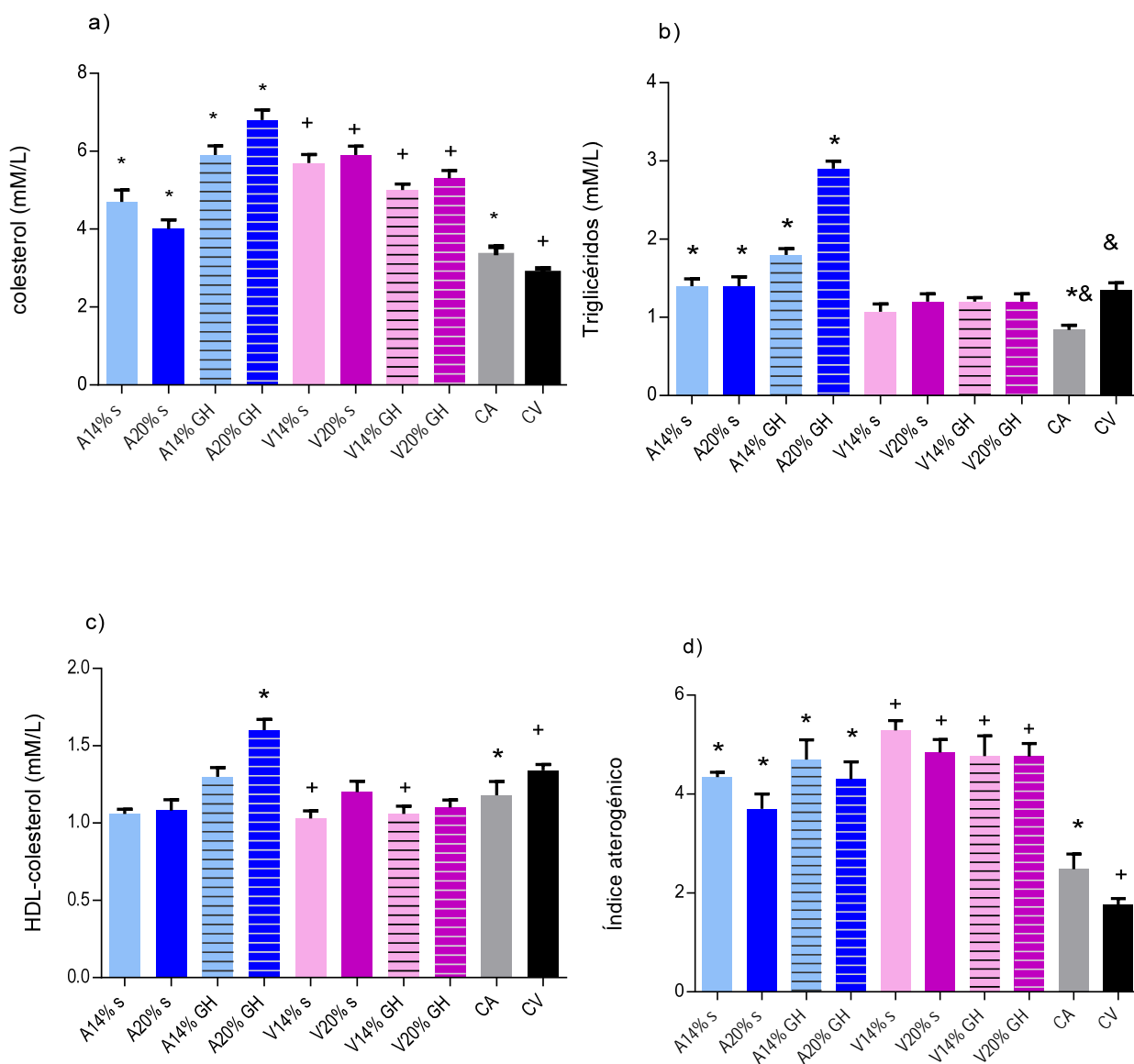


Gráfico 5: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c , adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) glucosa, b) leptina, c) IGF-1.

Las diferencias significativas en el grupo control se marcan encima de la columna correspondiente con los símbolos:
* diferencia con control adulto, + diferencia con control viejo, & diferencias entre grupos controles

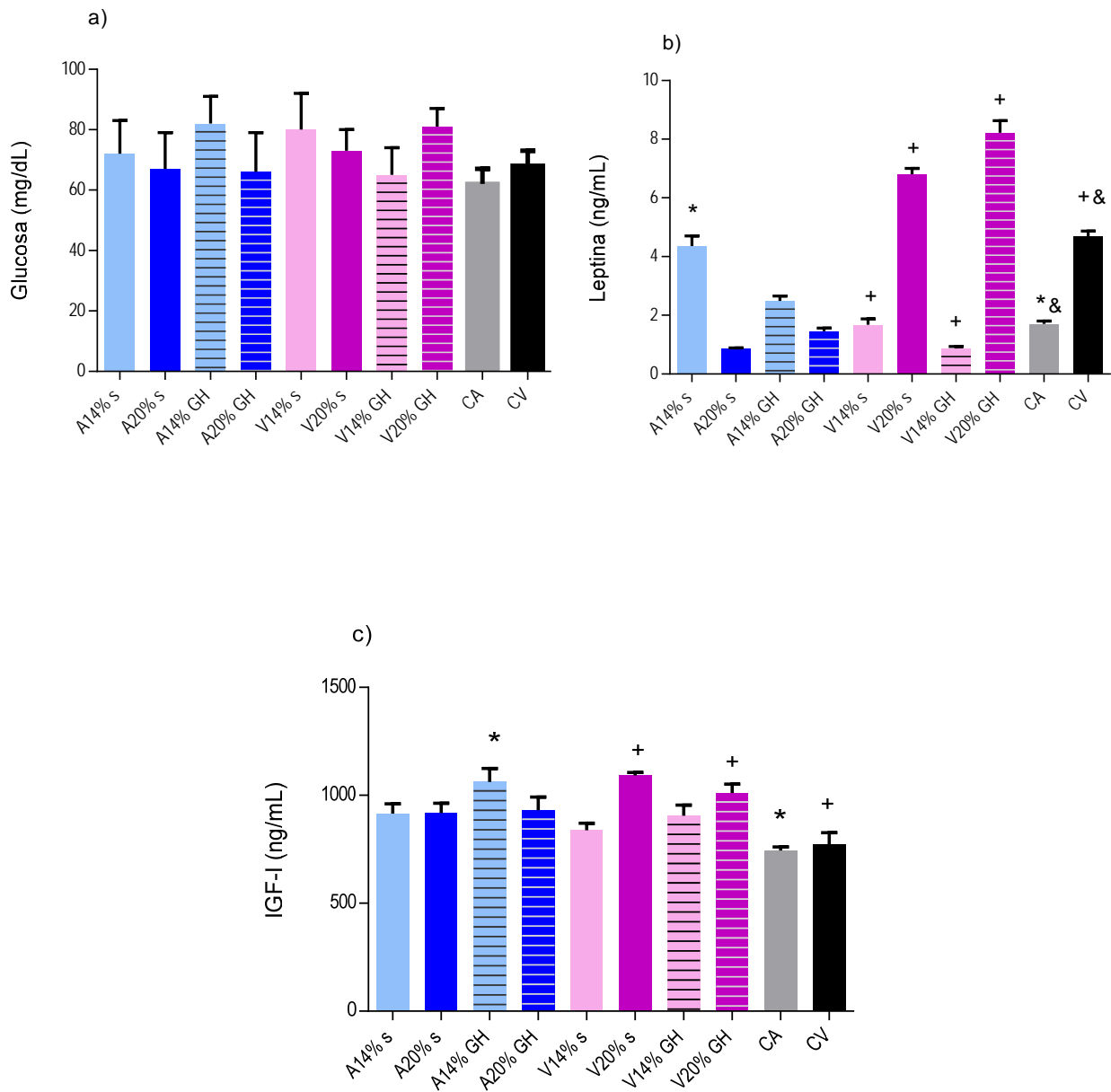


Gráfico 6: comparación de grupos control sometidos a dieta comercial con dietas conteniendo 14% y 20% de lactoalbúmina en ratones BALB/c , adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH, de las variables: a) PON 1, b) PON 1: HDL.

Las diferencias significativas en el grupo control se marcan encima de la columna correspondiente con los símbolos:
 * diferencia con control adulto, + diferencia con control viejo, & diferencias entre grupos controles

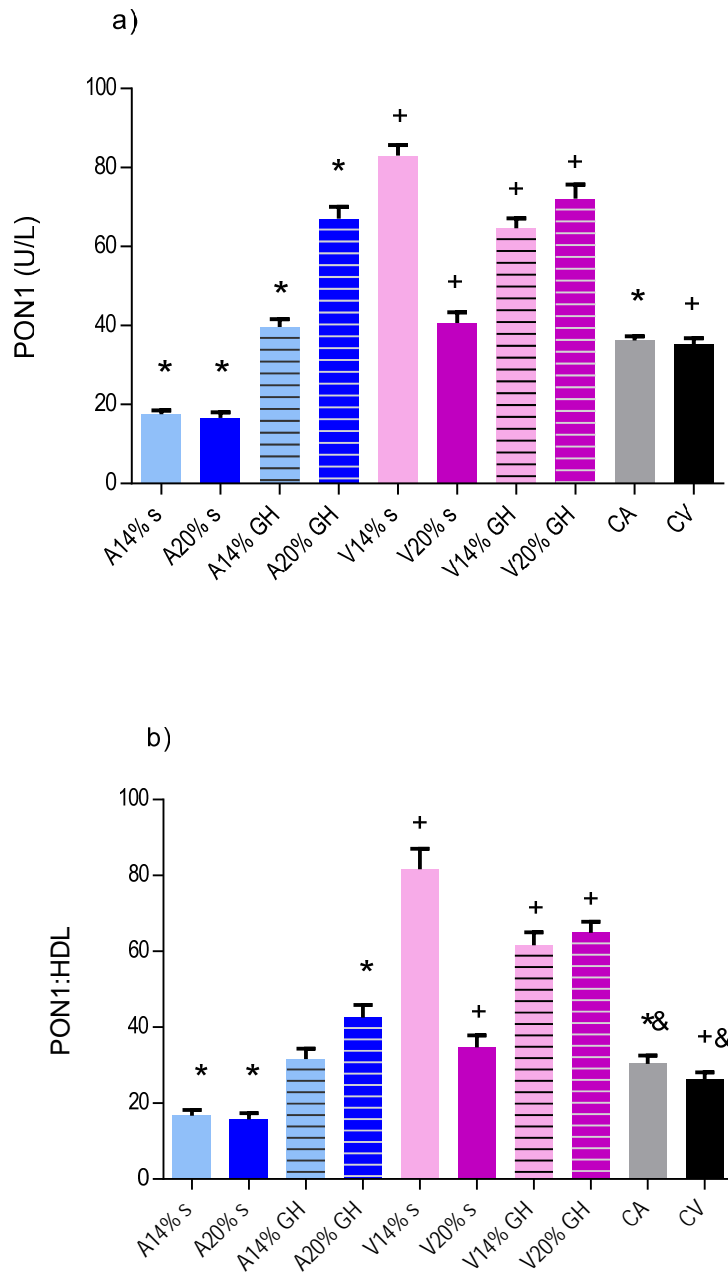


Gráfico 7. Relaciones lineales de la ganancia de peso y la ingesta total con peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

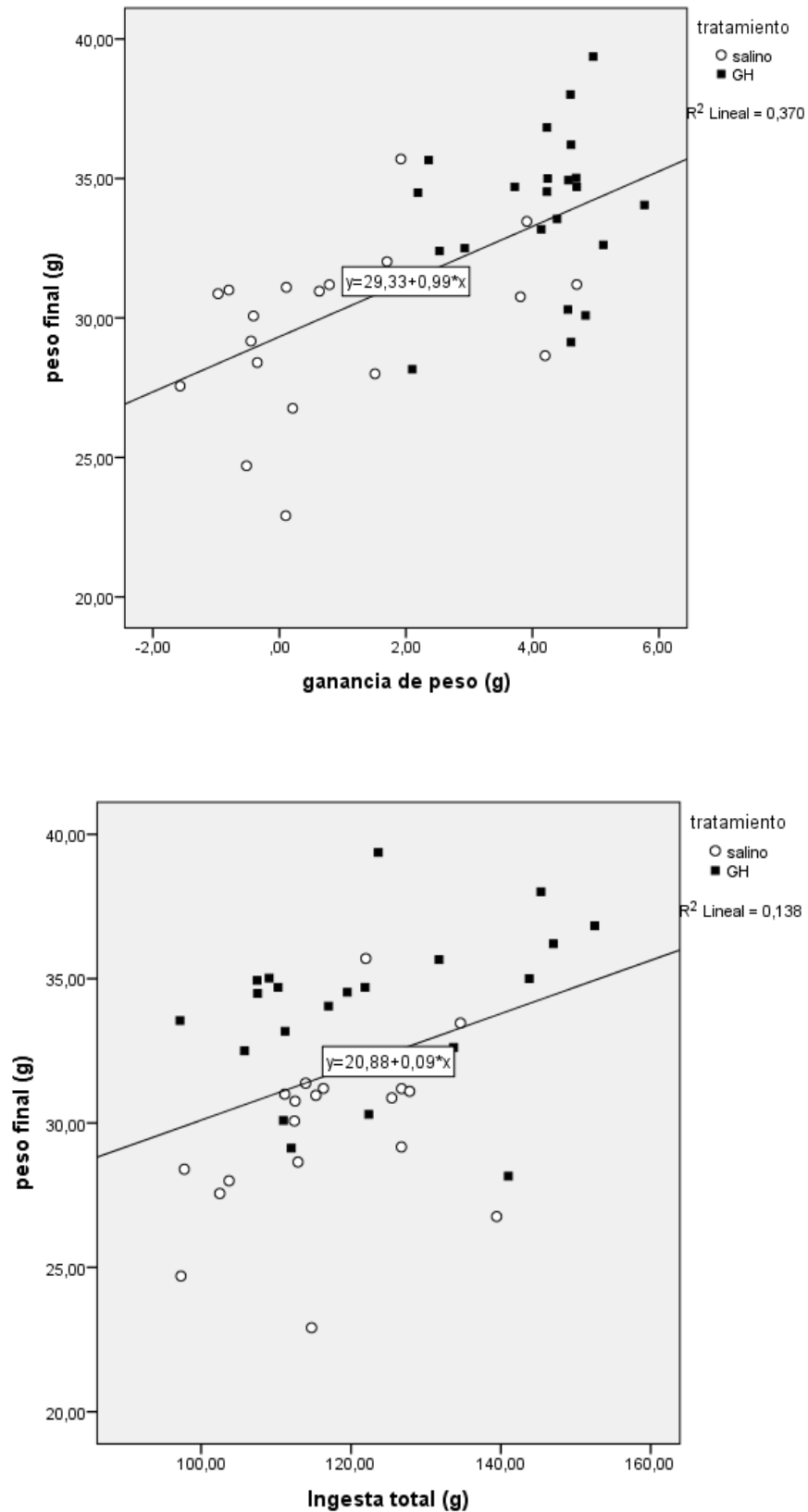


Gráfico 8. Relación lineal de la eficacia alimentaria con el peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

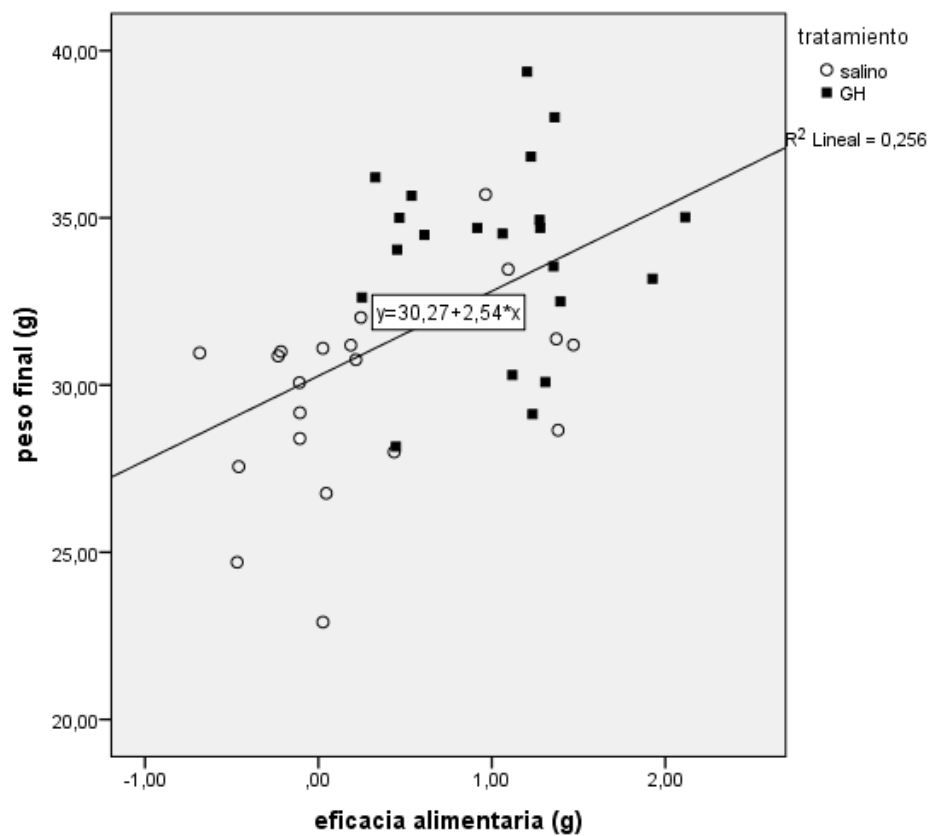


Gráfico 9. Relación lineal entre glucemia e ingesta total, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

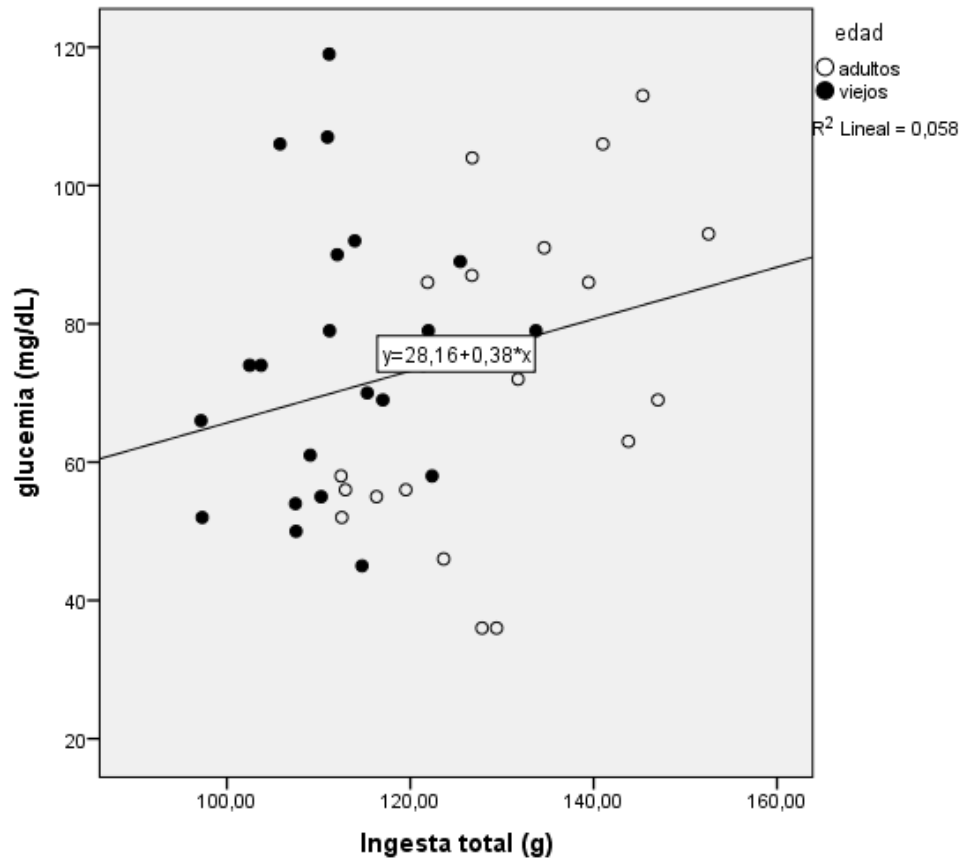


Gráfico 10. Relación lineal entre ganancia de peso y eficacia alimentaria, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

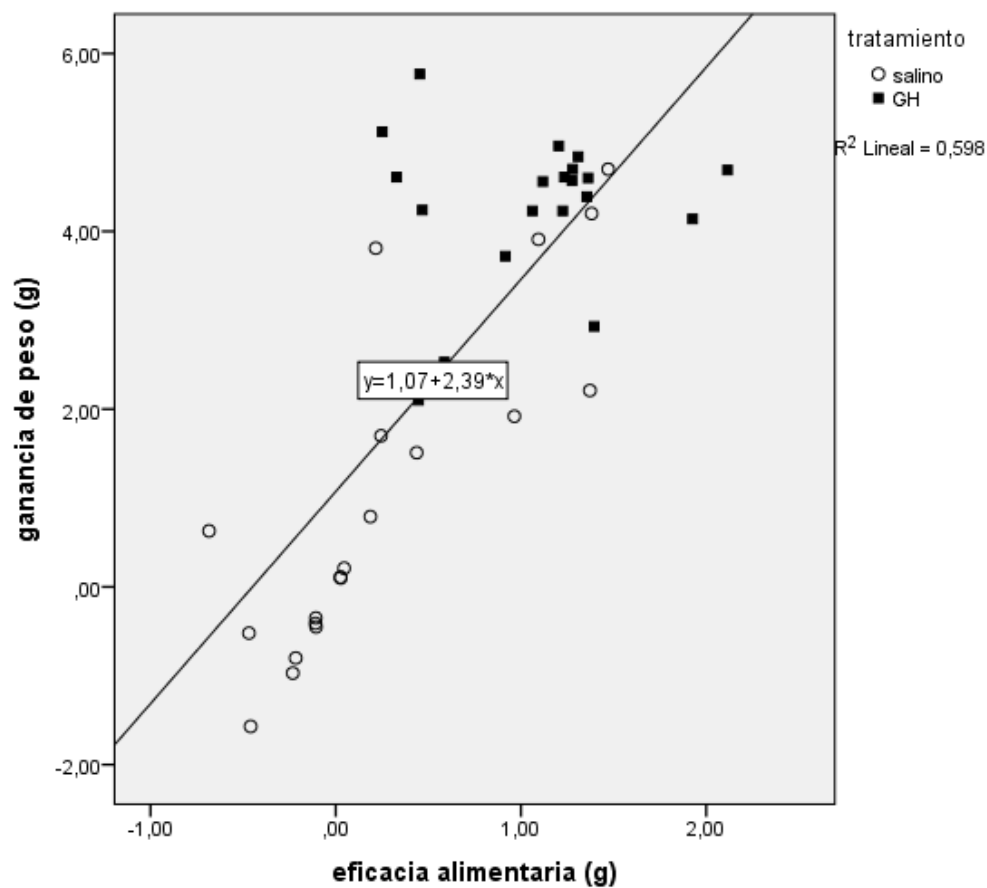


Gráfico 11. Relación lineal entre grasa corporal residual y peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

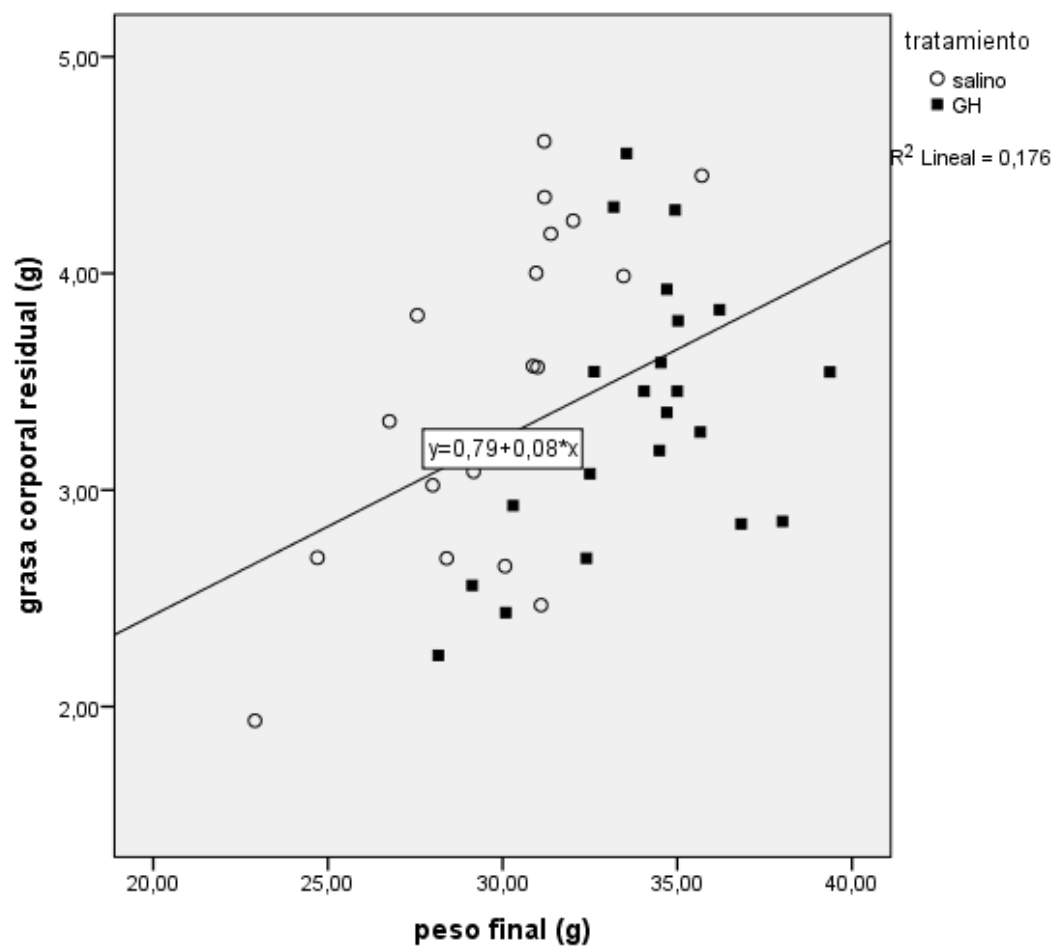
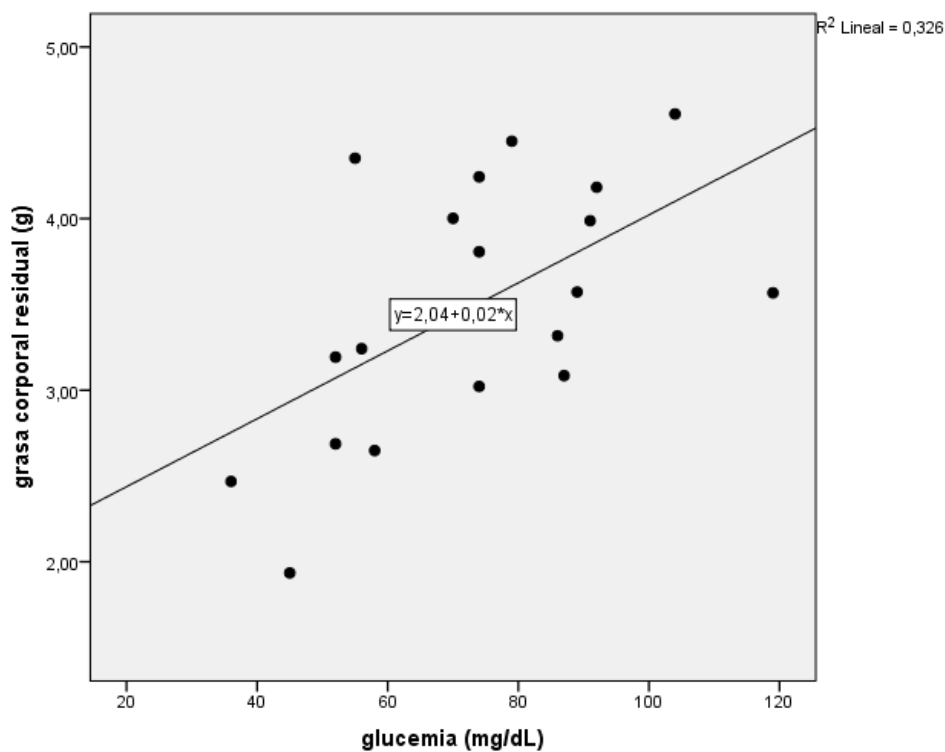


Gráfico 12. Relación lineal entre grasa corporal residual y glucemia, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) (a) y tratados con rhGH (b) y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

Ratones no tratados (salinos) (a)



Ratones rhGH tratados (b)

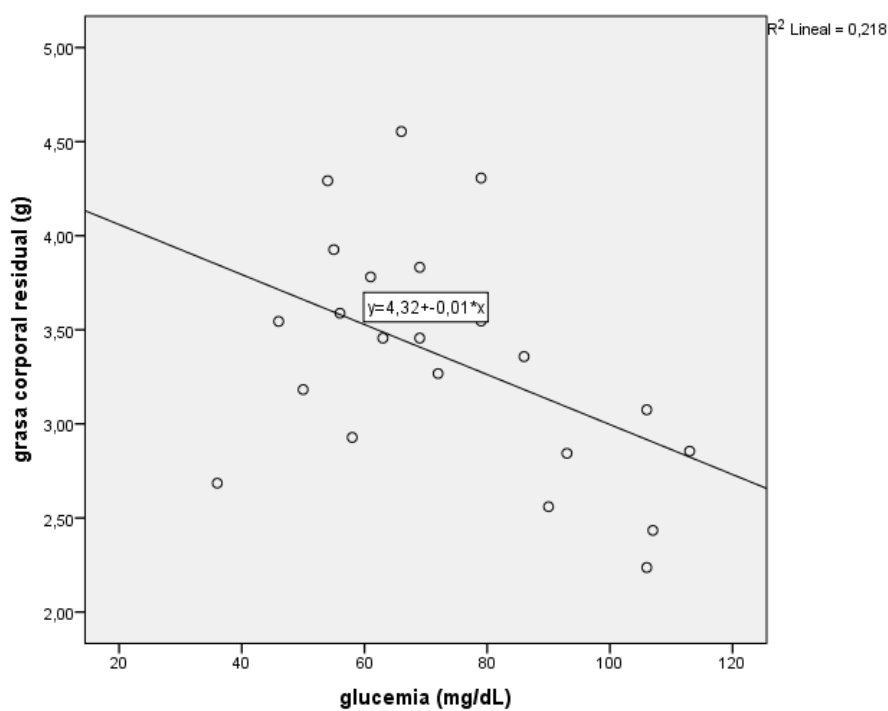


Gráfico 13. Relación lineal entre la suma de los músculos y el peso final, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

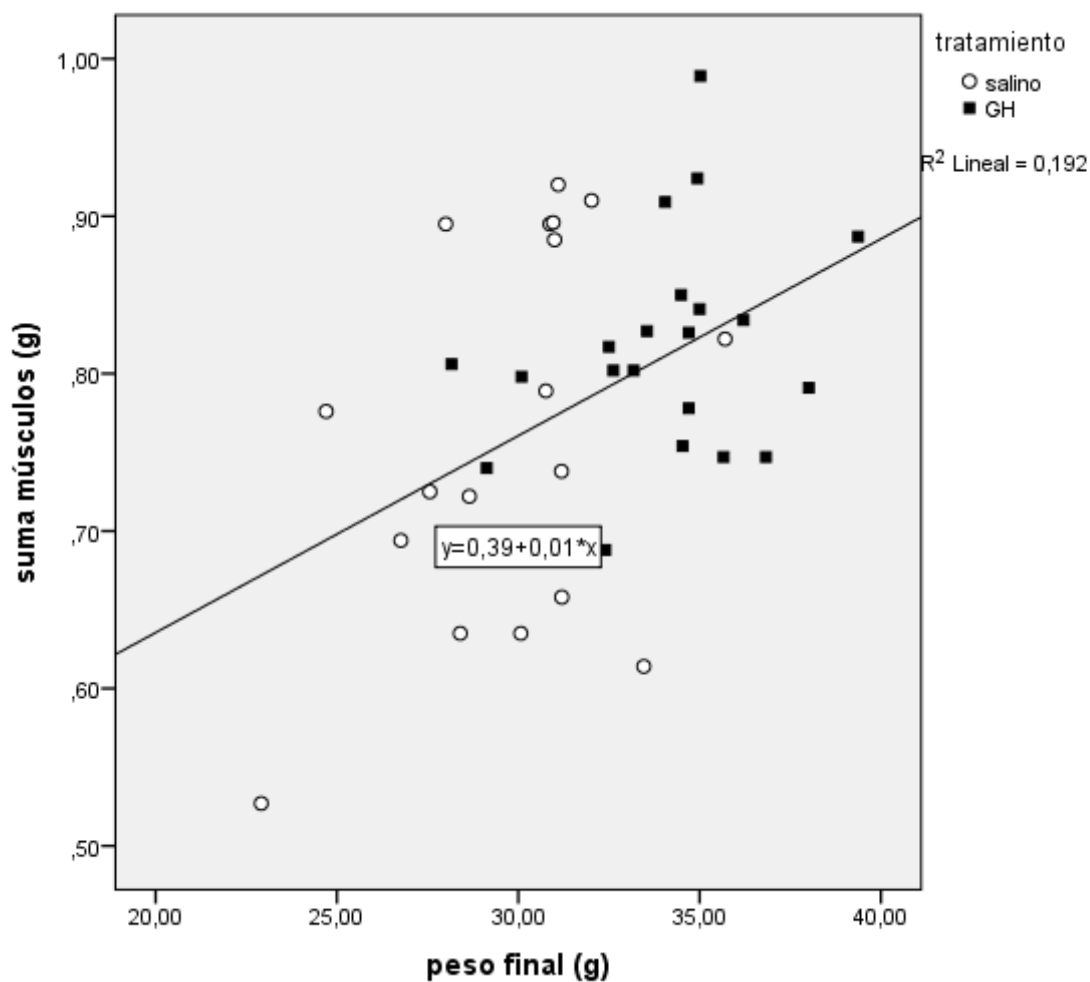
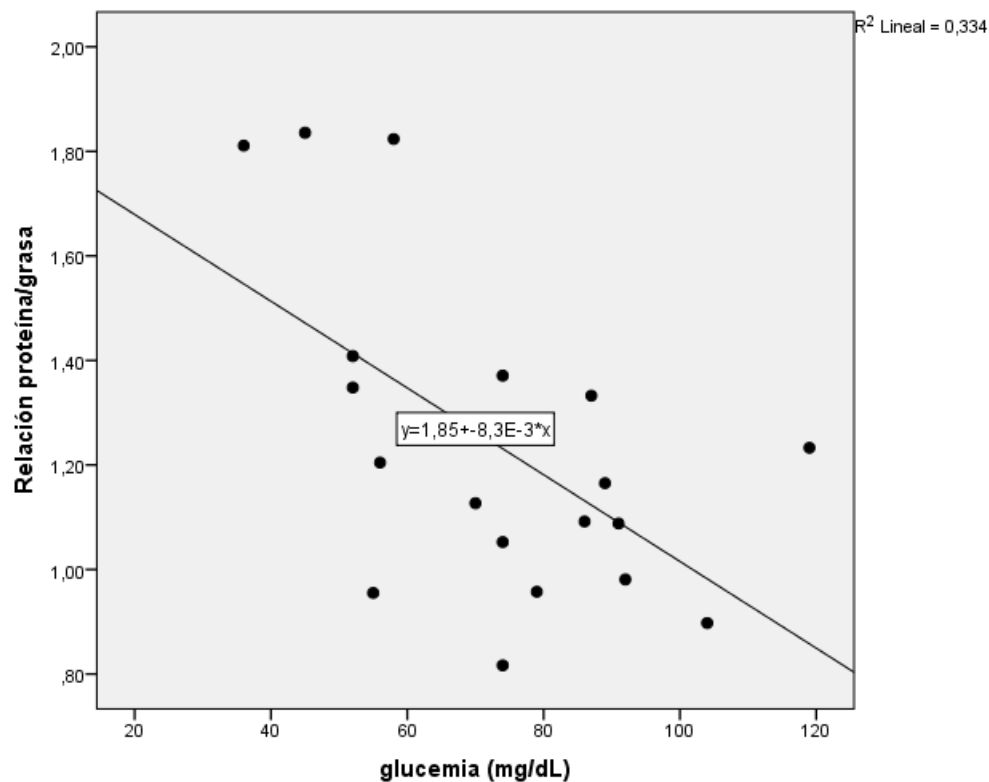


Gráfico 15. Relación lineal entre la razón proteína/grasa corporal y la glucemia, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) (a) y tratados con rhGH (b) y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

Ratones no tratados (salinos) (a)



Ratones rhGH tratados (b)

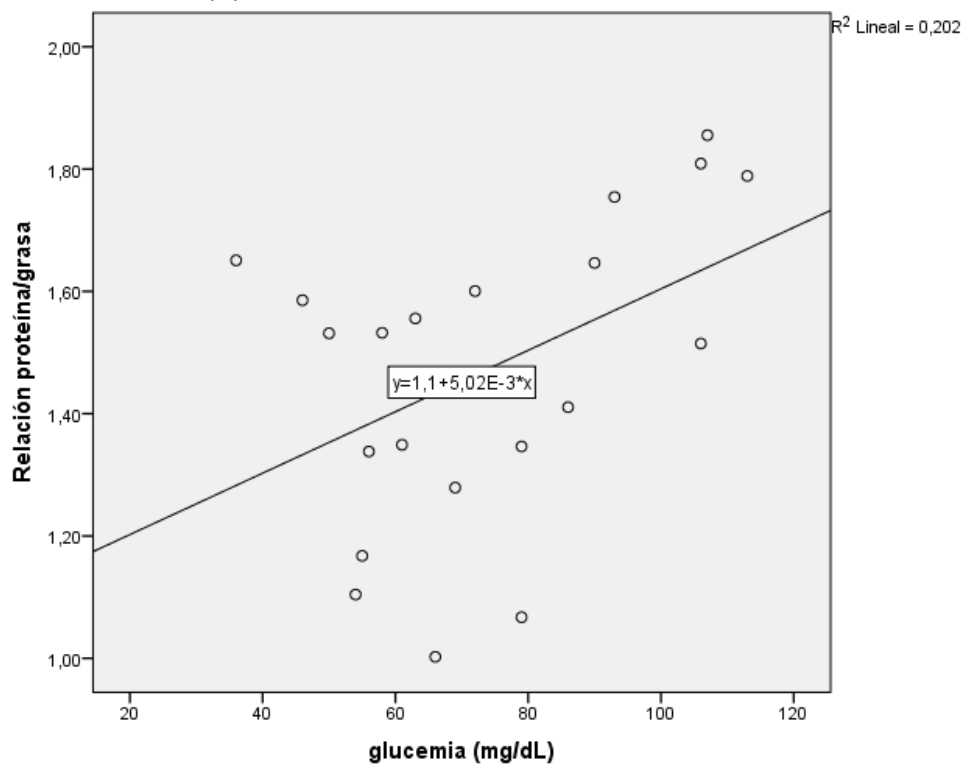


Gráfico 16. Relación lineal entre los pesos del corazón y del colon con el peso final corporal, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

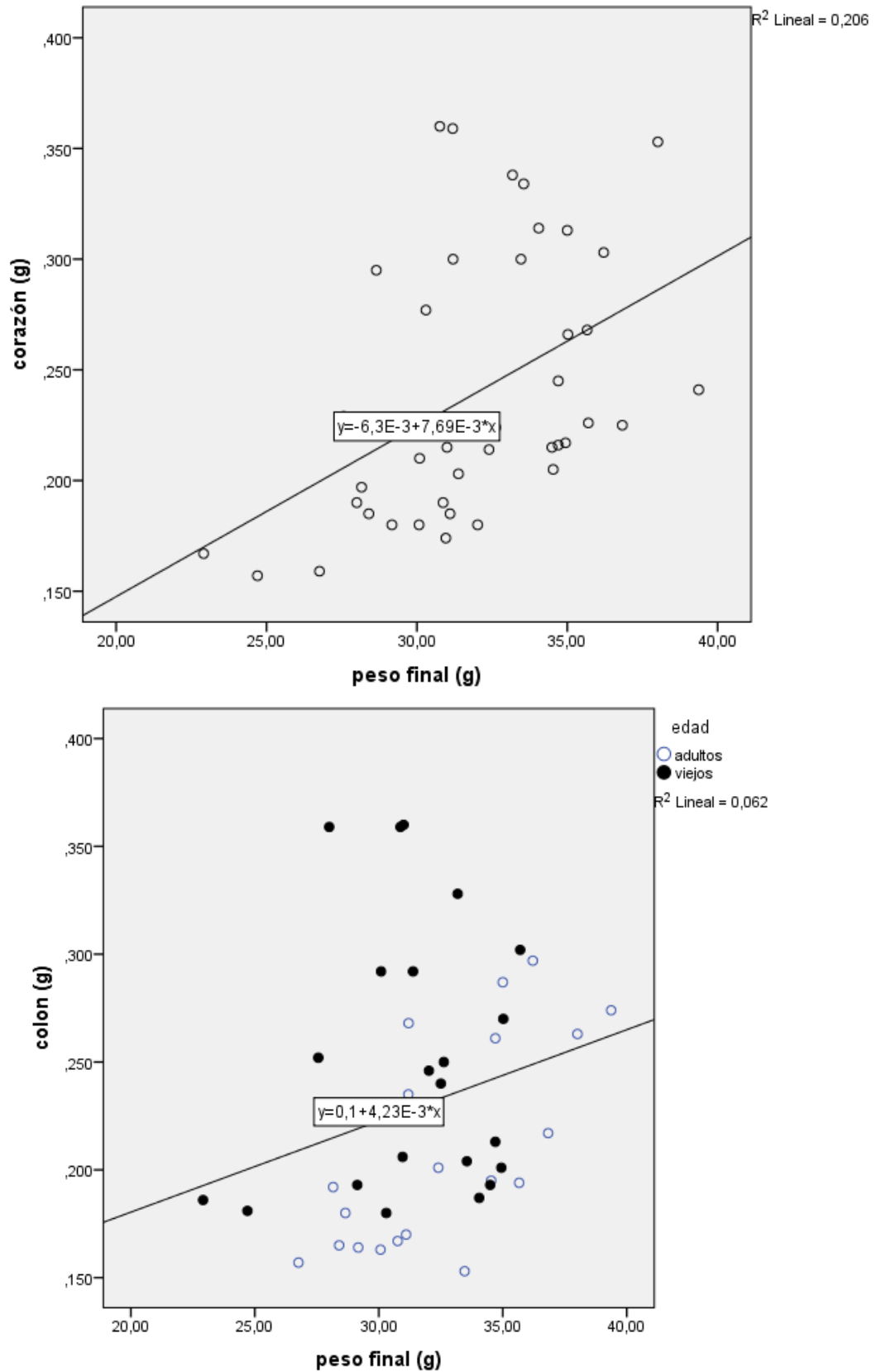


Gráfico 17. Relación lineal entre el peso del hígado y el peso final corporal, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

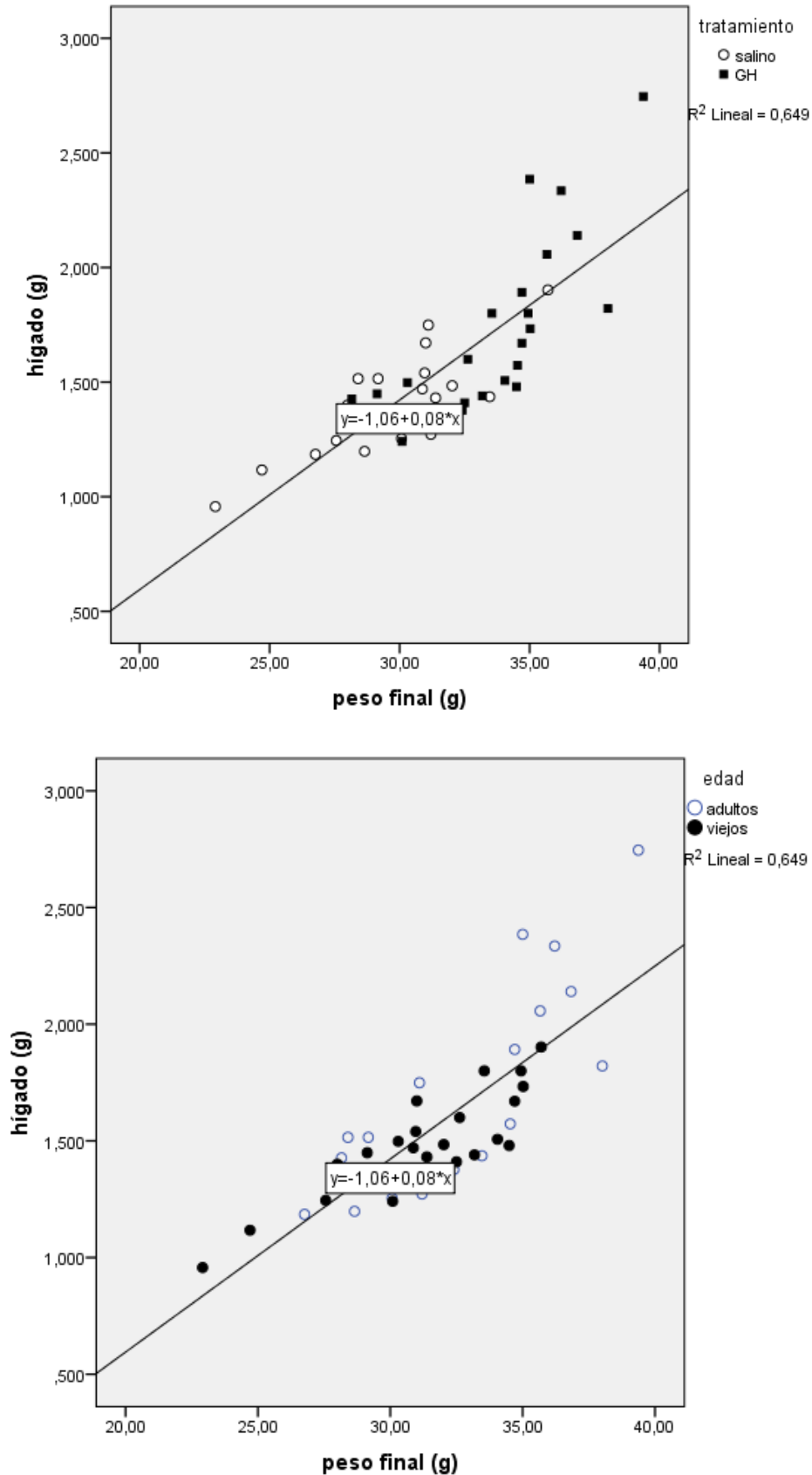


Gráfico 18. Relación lineal entre HDL y el peso final corporal, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

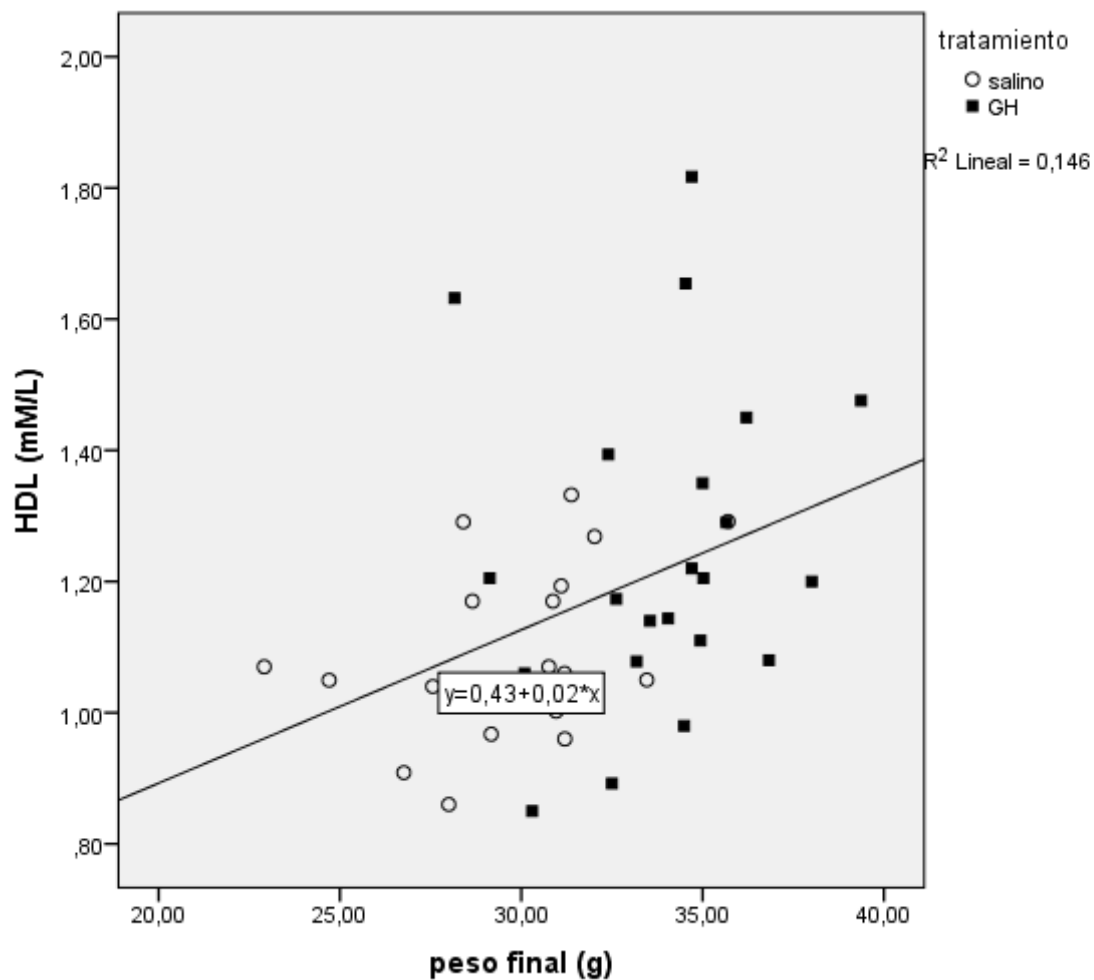


Gráfico 19. Relación lineal entre el valor de LPO y el peso final corporal, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

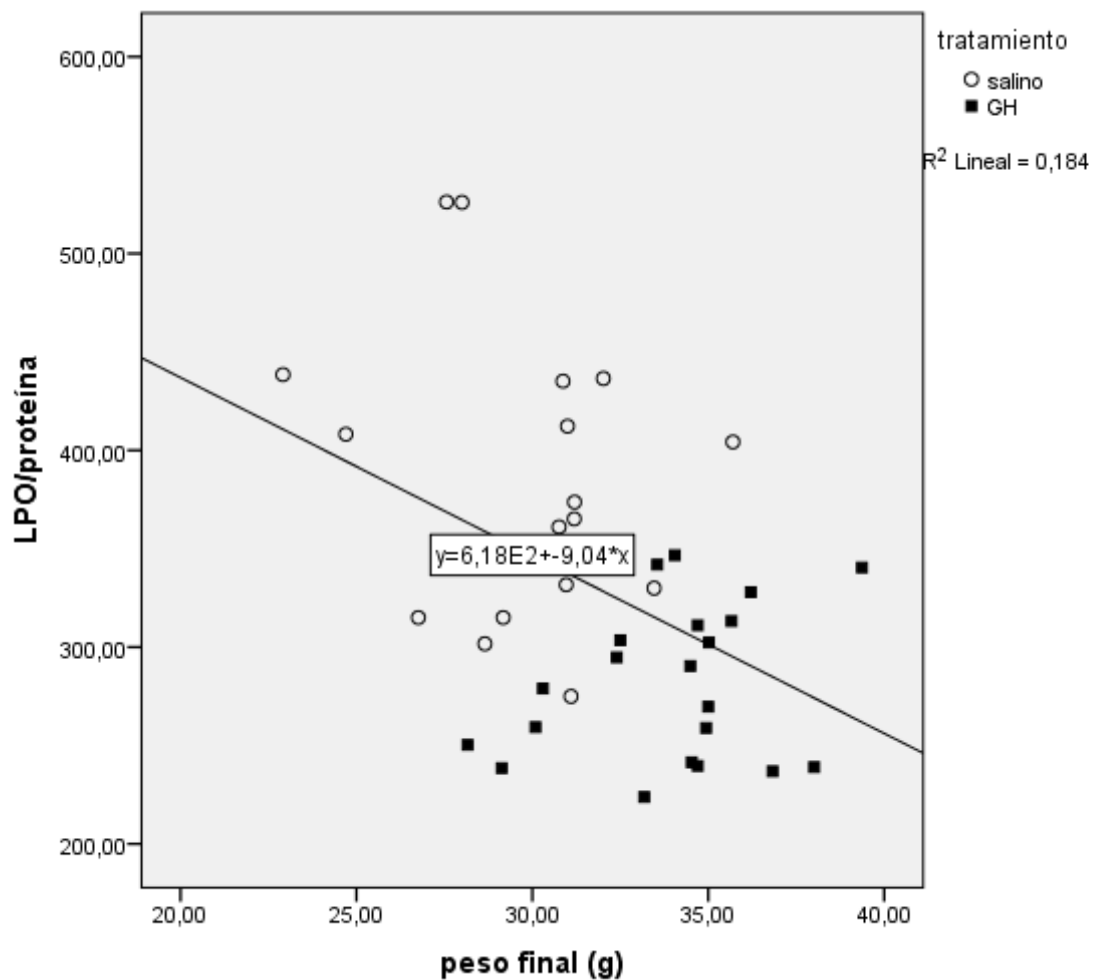


Gráfico 20. Relación lineal entre el valor de la muerte celular y PON1, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

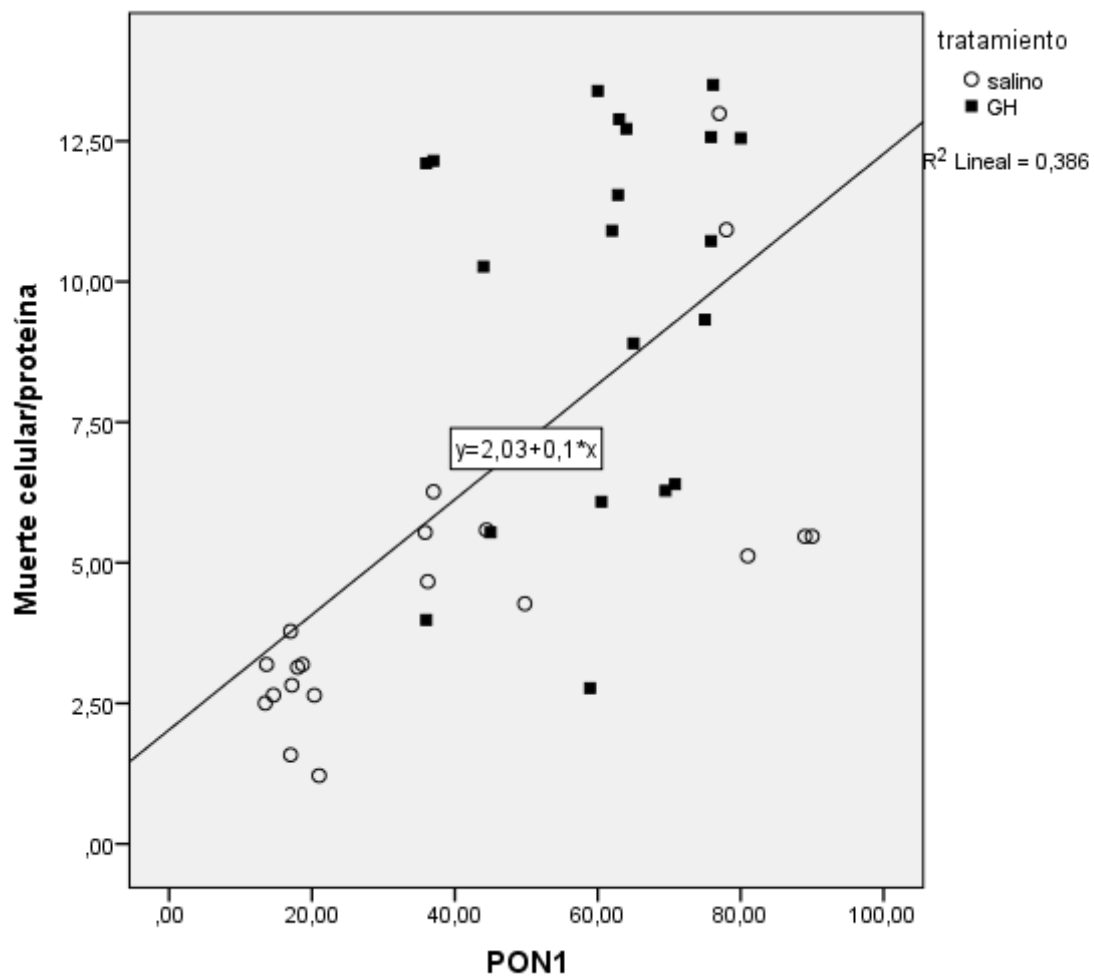


Gráfico 21. Relación lineal entre el valor de LPO y el peso vacío, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.

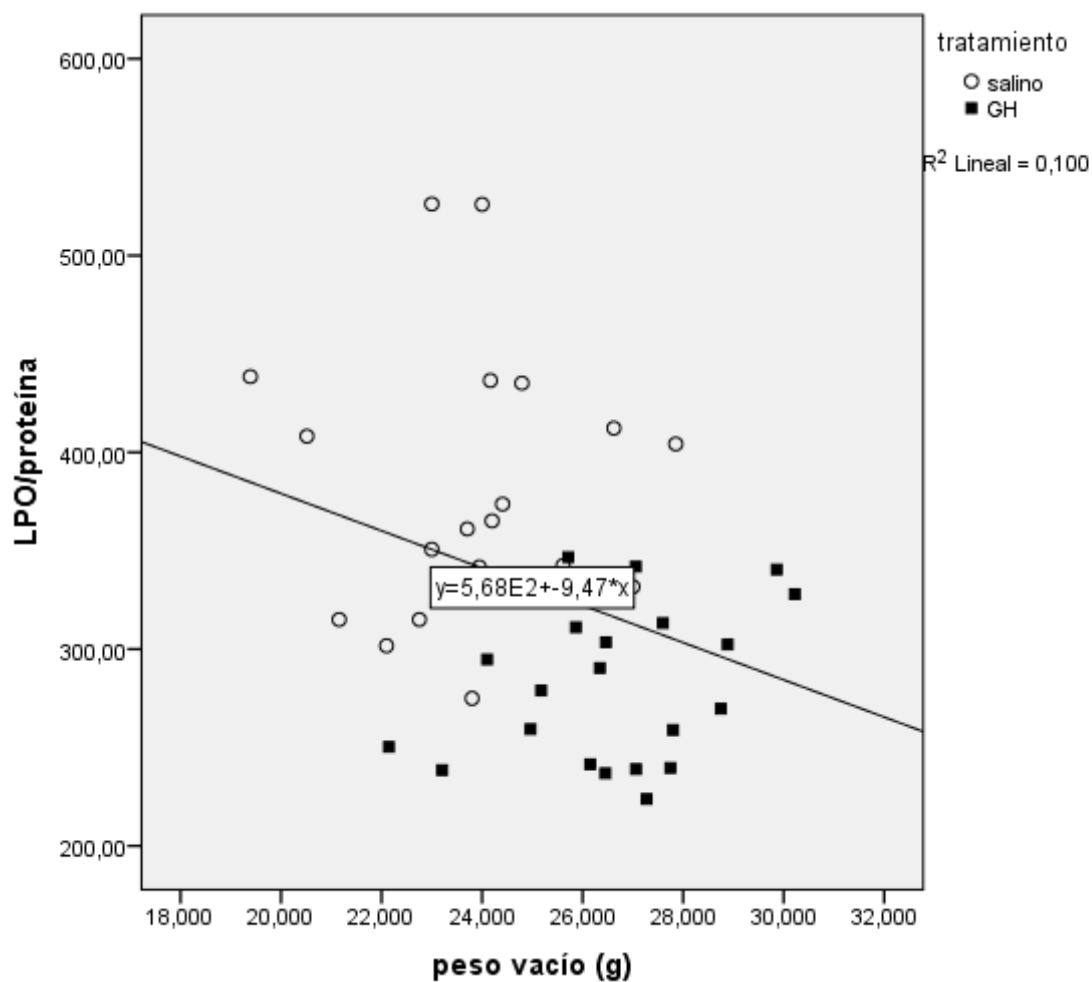
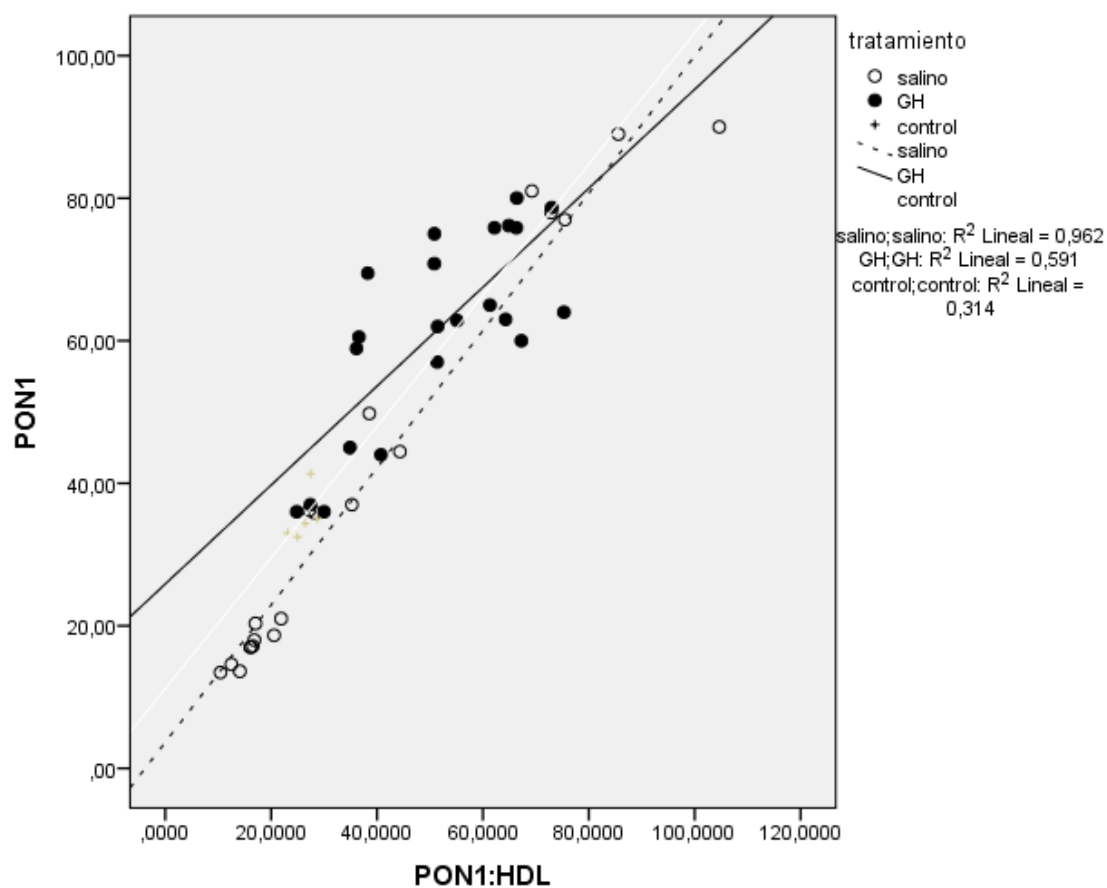


Gráfico 22. Relación lineal entre el valor de PON1 y la razón PON1: HDL, en ratones BALB/c, adultos y viejos, no tratados (salinos) y tratados con rhGH y sometidos a dietas con concentraciones proteicas del 14% y 20% de lactoalbúmina.



RESULTADOS

5.4. IMÁGENES

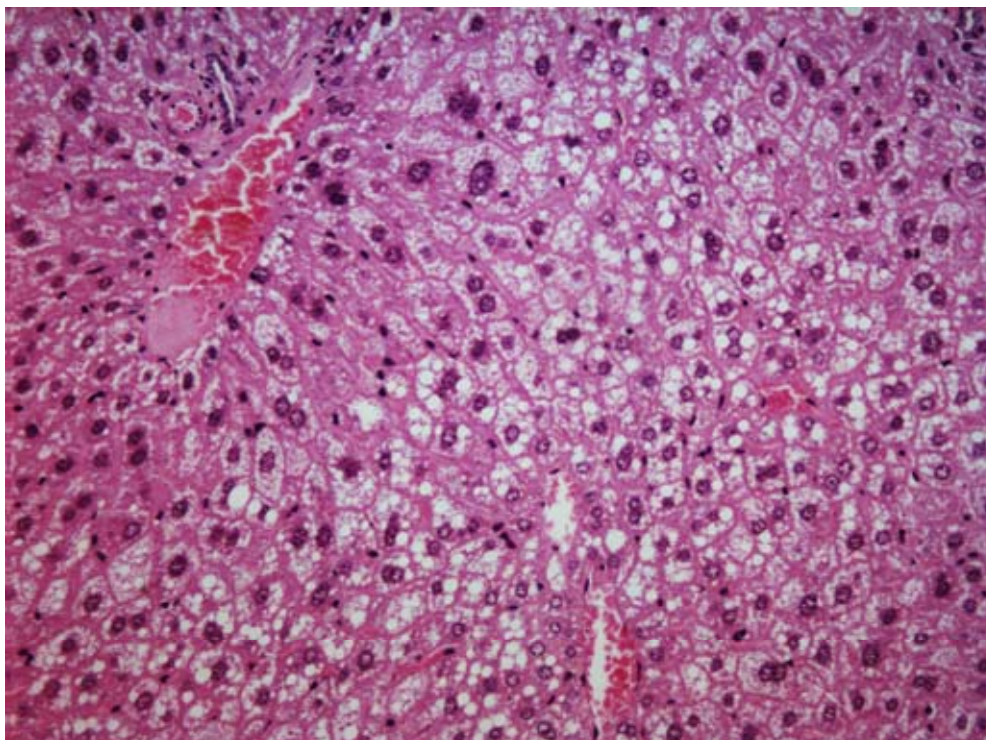


Imagen 1a. Corte histológico de hematoxilina y eosina de hígado de ratón adulto alimentado con dieta del 14% de lactoalbúmina.

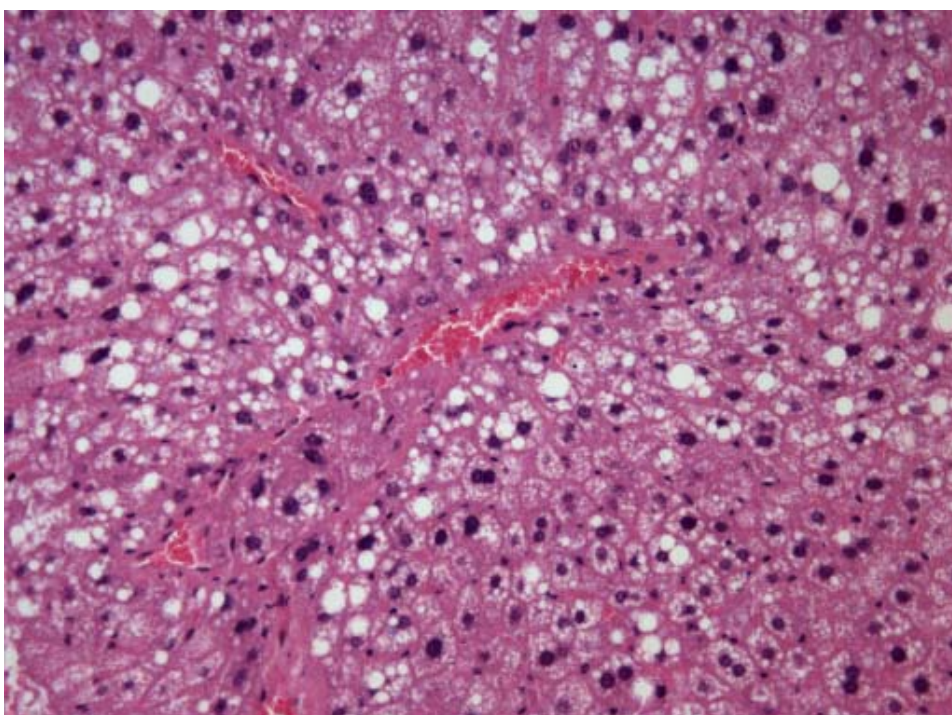


Imagen 1b. Corte histológico de hematoxilina y eosina de hígado de ratón adulto alimentado con dieta del 20% de lactoalbúmina.

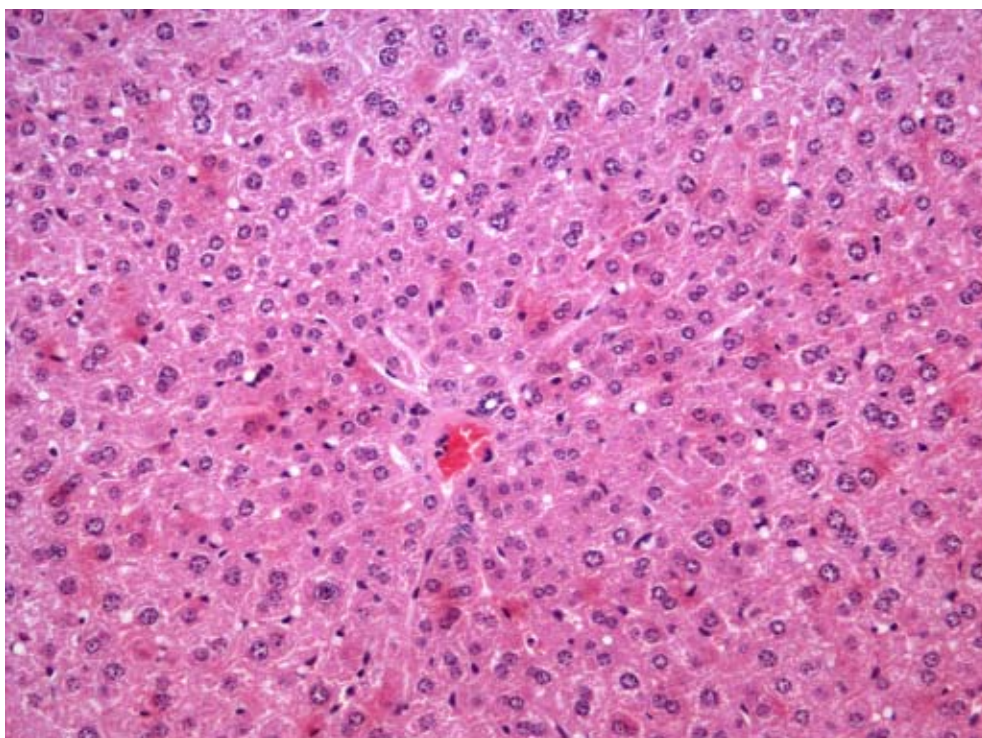


Imagen 2a. Corte histológico de hematoxilina y eosina de hígado de ratón viejo alimentado con dieta del 14% de lactoalbúmina.

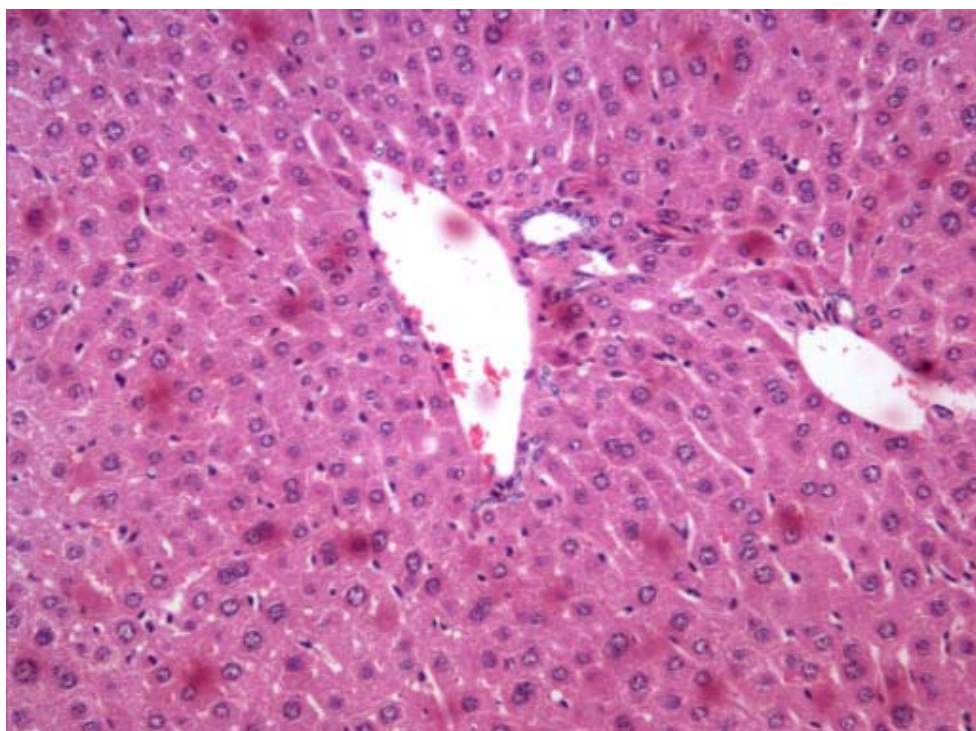


Imagen 2b. Corte histológico de hematoxilina y eosina de hígado de ratón viejo alimentado con dieta del 20% de lactoalbúmina.

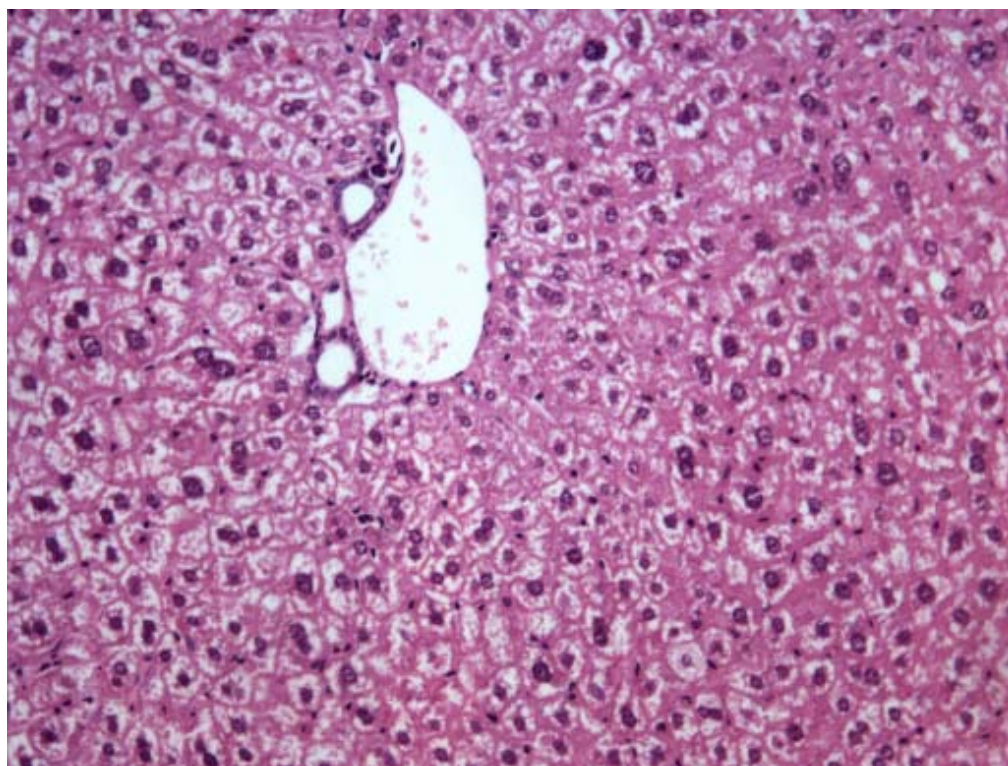


Imagen 3a. Corte histológico de hematoxilina y eosina de hígado de ratón adulto alimentado con dieta del 14% de lactoalbúmina y tratado con rhGH.

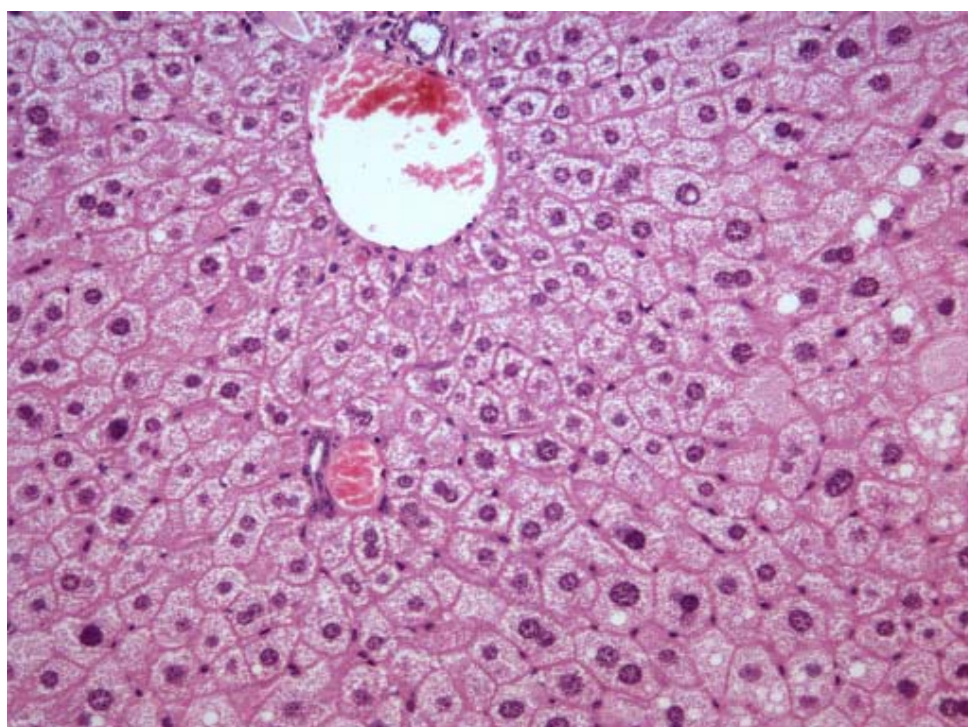


Imagen 3b. Corte histológico de hematoxilina y eosina de hígado de ratón adulto alimentado con dieta del 20% de lactoalbúmina y tratado con rhGH.

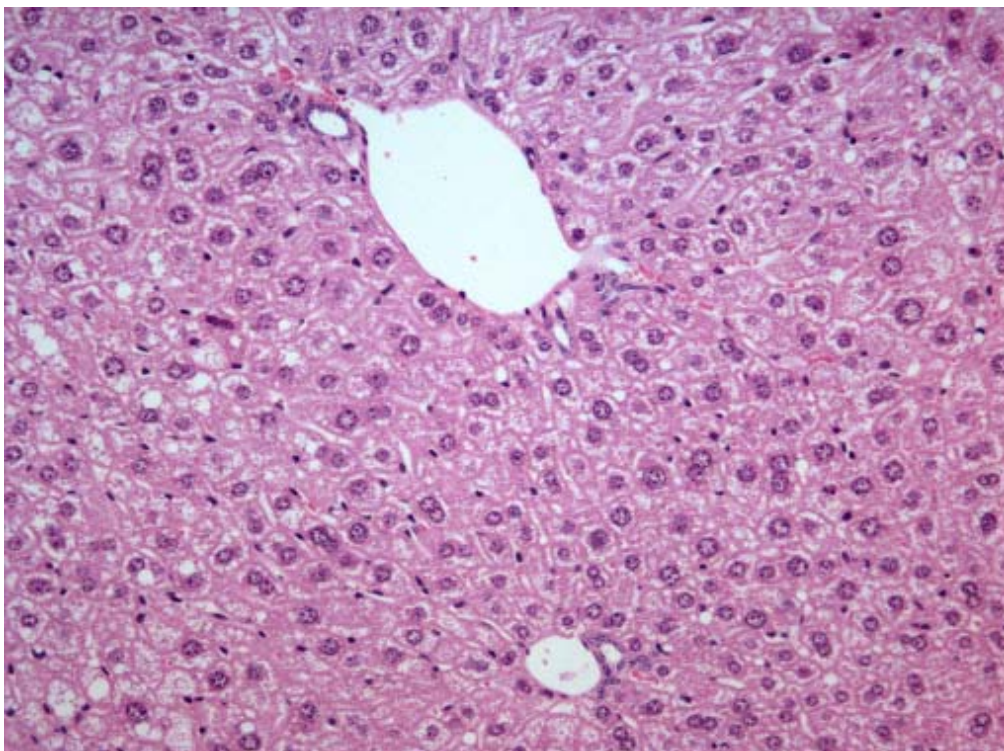


Imagen 4a. Corte histológico de hematoxilina y eosina de hígado de ratón viejo alimentado con dieta del 14% de lactoalbúmina y tratado con rhGH.

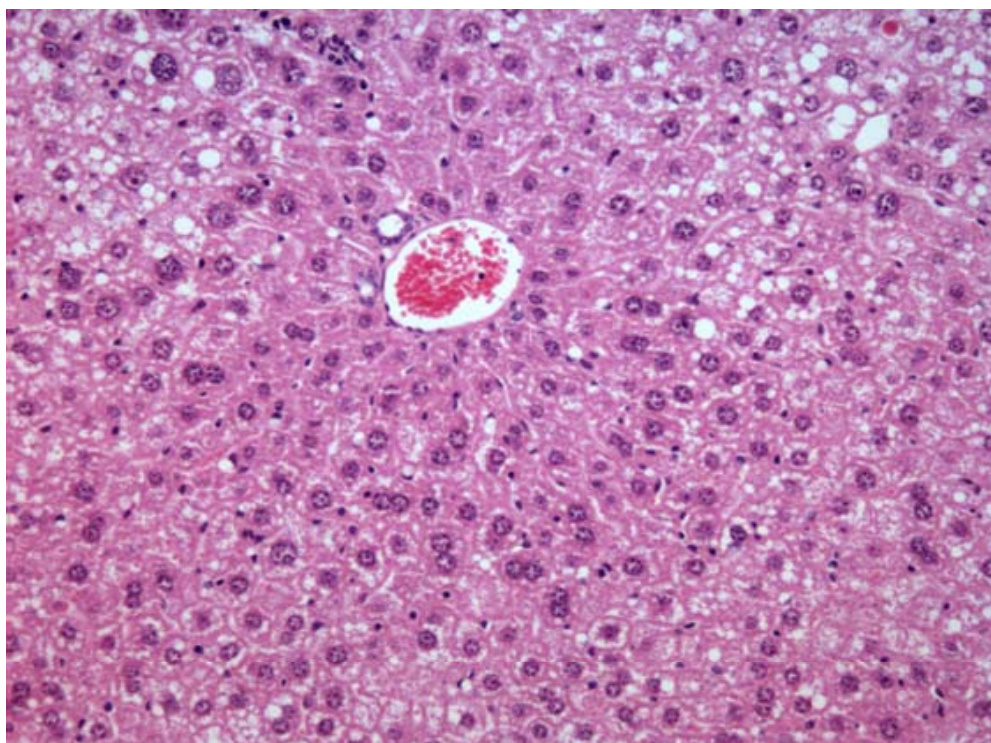


Imagen 4b. Corte histológico de hematoxilina y eosina de hígado de ratón viejo alimentado con dieta del 20% de lactoalbúmina y tratado con rhGH.

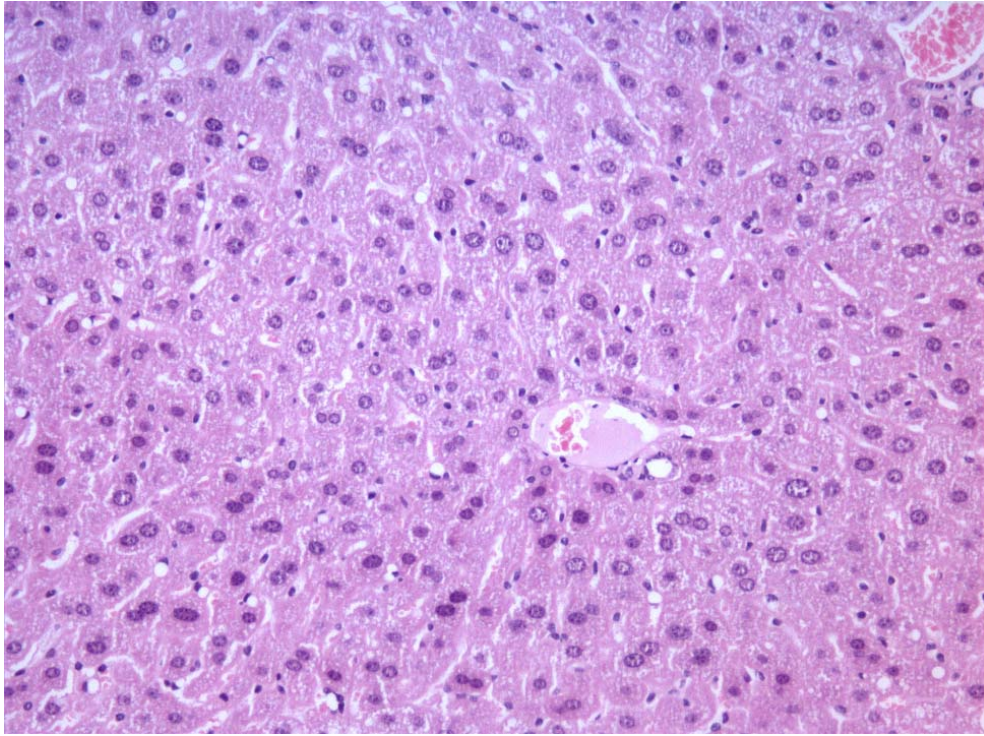


Imagen 5. Corte histológico de hematoxilina y eosina de hígado de ratón adulto alimentado con dieta comercial de mantenimiento.

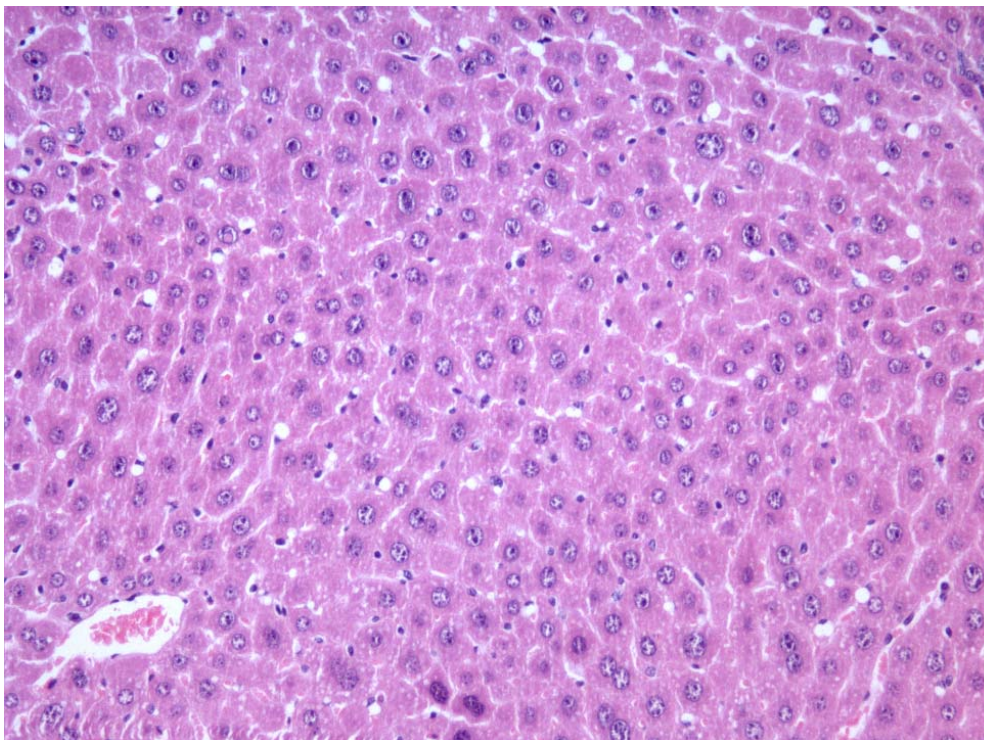


Imagen 6. Corte histológico de hematoxilina y eosina de hígado de ratón viejo alimentado con dieta comercial de mantenimiento.

6 DISCUSIÓN

En el presente estudio de esta tesis doctoral, los tres factores controlados: EDAD, TRATAMIENTO y DIETA, ejercieron su influencia sobre los parámetros de los ratones en estudio en un grado variable. En primer término tanto la EDAD, factor de diferencia entre animales adultos y viejos; como el TRATAMIENTO (administración exógena con hormona de crecimiento recombinante humana, rhGH), factor de diferencia frente a controles salinos, fueron ambos factores que resultaron significativos o muy significativos en muchos de los parámetros estudiados. Por otra parte, el factor DIETA (esto es, la concentración de lactoalbúmina de la dieta, 14% ó 20%), como factor independiente, resultó poco influyente sobre las variables experimentales de los animales de este estudio. Sin embargo, resultó destacable que a pesar de la relativamente pequeña diferencia entre los niveles de proteína de las dos dietas (14 y 20%) lo que supuso un 6%, su influencia directa sí se manifestó sobre algunos parámetros del perfil lipídico, y además fueron destacables las influencias indirectas de dicho factor DIETA a través de sus interacciones con los otros factores citados.

En primer lugar, en este apartado de discusión de la memoria de tesis doctoral, se discutirá el efecto de la diferencia de edad, en concreto de la vejez y sus consecuencias en los parámetros del experimento, posteriormente se discutirá el efecto del tratamiento con rhGH así como la interacción de estos factores. El efecto de la dieta, se discutirá tanto en relación con uno como con otro factor, así como con las interacciones con dichos factores en cada caso.

Efecto de la vejez sobre los ratones no tratados con hormona de crecimiento

La vejez determina en los seres vivos una serie de modificaciones metabólicas que en muchos casos favorecen el desarrollo de patologías (Allard y Duan 2011). Con el envejecimiento, los ratones de este estudio mostraron una disminución (aproximadamente de un 12%) de la cantidad de dieta ingerida con relación a los adultos (Tabla 1) (Tabla 10 ANOVA), ello es consistente con los hallazgos en otros grupos de animales, entre ellos los humanos, en los cuales las necesidades energéticas y la cantidad de dieta consumida disminuyen con la edad (Chapman 2004). Un menor consumo de dieta lleva consecuentemente a un menor consumo de proteína, especialmente cuando la dieta ingerida fue la de menor contenido proteico (14%) lo cual pudo derivar en una deficiencia energética general o determinados sustratos, como es conocido en determinadas patologías, y comprometer así el aporte adecuado de proteínas para el mantenimiento de las funciones fisiológicas (Chapman 2004). Por otra parte, la disminución del consumo de dieta, o el suministro de una dieta restringida en energía o en otros macronutrientes, tiene otra faceta y es la que preconiza sus beneficios en términos de salud y longevidad. A este respecto se han realizado investigaciones desde el siglo pasado (Weindruch 1996) y se siguen realizando trabajos en este sentido actualmente (Anderson, Shanmuganayagam y col. 2009) (Solon-Biet, Walters y col. 2015).

La evaluación del impacto de las diferentes dietas sobre el peso corporal conlleva la determinación de la cantidad de ingesta de dichas dietas así como del propio peso corporal, asimismo sería necesario calcular la ganancia de peso corporal, es decir

cuánto peso adquirieron en promedio los ratones al final del periodo experimental. Entre los animales salinos solo se pudieron constatar diferencias en ganancia de peso de los ratones adultos por el tipo de dieta consumida pero, sorprendentemente, fue la ingesta de la dieta conteniendo el 20% de lactoalbúmina la que llevó a ese grupo de ratones a una ganancia negativa frente a los animales alimentados con la dieta del 14% de lactoalbúmina que presentaron una ganancia positiva (Tabla 2). Además, se calculó el rendimiento del proceso, esto es: cuánto peso ganaron los ratones por cuánta dieta ingirieron, mediante el cálculo de la razón o del índice de eficacia alimentaria, o lo que es lo mismo el cociente entre ambos parámetros: ganancia de peso e ingesta. Sin embargo, aunque esta variable pudiera dar una idea global del proceso precisamente sólo señala la magnitud de aprovechamiento del alimento y no informa de cómo se producen los cambios corporales. En los animales administrados con solución salina no se apreciaron diferencias significativas en la eficacia alimentaria (Tabla 2), ya fuera por la dieta o por la edad, es decir que los ratones mantuvieron un aprovechamiento del alimento aproximadamente similar, lo que parece razonable en animales que no sometidos a manipulación ni tratamiento y que no estaban en un periodo de crecimiento. Las diferencias que se observaron en su peso final se debió simplemente al mayor o menor consumo de alimento (Tabla 2) (Tabla 11, ANOVA).

Gracias al análisis de la regresión lineal se pudo comprobar que en el conjunto de los animales existió una relación lineal significativa entre el peso final del animal y la ganancia de peso ($R=0,608$, $P<0,001$) (Gráfico 7), es decir que aquellos ratones que presentaban pesos mayores también habían ganado más peso, que además eran

aquellos tratados con rhGH. También se pudo comprobar la existencia de relaciones lineales del peso final con la ingesta y con la eficacia alimentaria (Gráficos 7 y 8). Señalando las correspondencias entre peso corporal e ingesta, así como la relación entre los posibles incrementos de peso que pudieron experimentar los ratones con la ingesta necesaria para convertir sustratos en peso, y consecuentemente esa relación se tuvo que mantener para la eficacia con el peso como así se constató con el análisis de los resultados. El hecho de que las relaciones fueran lineales destacaron el modo de aprovechamiento del alimento, aunque, por otra parte, condicionaron las relaciones fuera lineal o cuasi-lineal en el rango analizado; aun así el que las relaciones resultaran significativas parece señalar la dependencia entre el alimento ingerido y el alimento utilizado por el animal para incrementar su masa corporal y que la forma de esa dependencia fuera lineal o aproximadamente lineal como se ha indicado, pero al igual que en el caso del análisis de la eficacia alimentaria no se apreciaron diferencias entre los grupos señalando al igual que entonces que no hubo diferencias de calidad o cualidad entre los diferentes grupos de ratones en función de la edad o por la dieta suministrada.

Como se ha señalado previamente, la eficacia alimentaria no señala la calidad ni la cualidad de las modificaciones ponderales; como tampoco serían excesivamente informativas en ese sentido las relaciones lineales ingesta-peso. Por ello resulta muy relevante la determinación o evaluación de las modificaciones de los parámetros ponderales como el peso. Así, no se valoraría de igual modo un incremento del contenido graso corporal, lo cual en principio no sería conveniente en ninguna circunstancia de las que normalmente suelen considerarse como son desarrollo o

bienestar humano (DiPietro, Katz *y col.* 1999) o producción animal (Agis-Torres, Lopez-Oliva *y col.* 2002) (List, Palmer *y col.* 2009) (Palmer, Chung *y col.* 2009), que un incremento de la masa magra, lo que sería deseable tanto en uno como en otro caso.

Por ello, para determinar el correcto aprovechamiento del alimento, según los citados estándares de salud (DiPietro, Katz *y col.* 1999), se midieron los diferentes depósitos grasos corporales, así como el depósito graso total y la composición corporal en especial, la grasa y la proteína corporal. Se encontró que los animales más grandes en peso también tenían mayor contenido en grasa, lo cual se pudo correlacionar con las relaciones lineales grasa corporal con peso final en todos los grupos (correlación significativa $R=0,420$ $P=0,006$) (Gráfico 11), y que los ratones acumularon grasa especialmente con la madurez y la vejez ya que se produjo un incremento de la proporción de tejido graso frente a los ratones adultos, a pesar de que la cantidad de dieta ingerida por los animales fue significativamente menor que la que se encontró en los adultos (Tabla 1). Es decir, que los ratones viejos sin tratamiento hormonal acumularon grasa (un 166% más de la suma de los diferentes depósitos grasos corporales) de forma significativa (Tabla 12 ANOVA), y fue precisamente en esos depósitos donde se acumuló la grasa en mayor cantidad ya que la diferencia de grasa intramuscular (grasa corporal residual) fue de un 8% en los viejos frente a los adultos. Ello sucede de forma similar también en otros grupos de animales, como los mamíferos, y se ha estudiado especialmente en humanos (DeNino, Tchernof *y col.* 2001) (DiPietro, Katz *y col.* 1999), donde existe la preocupación por el mantenimiento de una calidad de vida dentro de unos

parámetros para edades avanzadas y mayor longevidad. En estos ratones viejos, el nivel de proteína en la dieta sí resultó relevante ya que aquellos animales que fueron alimentados con el nivel del 20% de lactoalbúmina presentaron un exceso de grasa (entre un 10% y un 43%, mayor) en los diferentes depósitos (Tabla 3) frente a sus controles alimentados con la dieta del 14%; pero además, se pudo constatar la existencia de una interacción entre el nivel proteico de la dieta ingerida y la edad de los animales en relación al contenido de grasa corporal (análisis de la varianza, interacción EDADxDIETA significativa, ANOVA Tabla 12). También se encontró dicha interacción en un nivel significativo en cada uno de los incrementos de los depósitos grasos corporales (ANOVA, Tabla 12), lo que parece demostrar la importancia de las etapas de la vida en el metabolismo y por tanto en el modo cómo puede determinar el tipo de alimentación en cada una de las mismas para llevar a diferentes resultados que pueden diferir notablemente y en cómo se van a utilizar los sustratos energéticos (Solon-Biet, Walters *y col.* 2015). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de ratones salinos, adultos y viejos, alimentados con las dietas conteniendo lactoalbúmina y los controles alimentados con la dieta comercial salvo en el caso del grupo de los adultos alimentados con el 14% que si superaron a sus controles (Gráfico 1a y b); mientras que en los depósitos grasos, abdominal y gonadal, así como en la suma de depósitos grasos destacó el grupo de ratones viejo 20% salino superando a los controles de dieta comercial; presentando menor peso el depósito de grasa abdominal correspondiente al grupo de ratones viejos 14% salino (Gráfico 1 c, d y e). Ello parece mostrar que las dietas utilizadas no mostraron diferencias drásticas en la redirección de sustratos hacia los depósitos grasos.

Es posible comprobar la derivación de los sustratos alimentarios hacia un tipo de depósito ya sea el magro o el graso, mediante la utilización de la relación proteína/grasa, que en este sentido parece ser un índice bastante adecuado a los propósitos pretendidos (Agis-Torres, Lopez-Oliva y *col.* 2002). El análisis de dicha relación en este estudio pareció confirmar los resultados obtenidos previamente con las medidas de la composición grasa, ya que indicaría la propensión a la utilización de los sustratos para almacenar grasa corporal frente al almacén magro, y lo que quizá pueda resultar sorprendente: un aumento de la proporción en la proteína ingerida en la dieta suministrada a los viejos, en el caso de la dieta experimental conteniendo lactoalbúmina, lo cual resultaría contraproducente desde el punto de vista del estado de salud cardiovascular ya que parecería conducir a un aumento del depósito graso con la consecuente relación con el aumento de lipoproteínas del tipo VLDL de forma similar a como se ha descrito en ratones (Yamazaki, Sasaki y *col.* 2005). En este caso sí se pudo comprobar una diferencia de la razón proteína/grasa entre los grupos de ratones adultos alimentados con lactoalbúmina y los controles alimentados con dieta comercial, ya que en los primeros se encontró mayor tendencia a la derivación de sustratos a grasa más que a proteína (Gráfico 2e). Fue ello una prueba del valor de estudiar esta razón ya que el análisis por separado de los componentes grasos (como se ha discutido previamente) o de los músculos y de los componentes proteicos no mostró dicha evidencia (Gráfico 2a, b, c, y d).

Por otra parte se constató que los niveles de la concentración de glucosa en sangre de los ratones se correlacionaron significativamente tanto con la ganancia de peso

($R=0,608$ y $P<0,001$) (Gráfico 7) como con la razón proteína/grasa ($R=-0,578$ y $P=0,010$) (Gráfico 15). Sin embargo, tanto la acreción proteica corporal, como la acreción del músculo en estas edades no fue muy significativa, ni parecería tener sentido que lo fuera ya que el desarrollo corporal debió concluir mucho tiempo atrás, entre el destete y la pubertad (Agis-Torres, Lopez-Oliva y col. 2002). Sin embargo, si apareció una relación significativa entre el tamaño del animal y su masa muscular en todos los grupos, lo que también parece tener sentido si se atiende a la masa muscular en su función de soporte estructural y por tanto necesariamente relacionada con el tamaño corporal. Los diferentes tipos de músculos pueden sufrir modificaciones dependiendo del tipo de ejercicio al que se ven sometidos en función de la estabulación de los animales y así resultaría que bajo condiciones de inactividad se podría encontrar que determinados músculos disminuyen su tamaño (Qiu, Mintz y col. 2014), mientras que con el ejercicio también es posible encontrarse sin modificaciones morfológicas musculares (Higa, Bergamo y col. 2012) a no ser que se instaure algún tipo de tratamiento como el hormonal; pero también debería ser función de la edad del animal y de su estado de salud. Así, los animales más activos podrían ejercitarse y con ello llevar a que se presenten modificaciones morfológicas de los músculos precisamente por esas actividades. En cualquier caso, en los ratones del presente trabajo los resultados parecen demostrar que con la vejez se produjera en el conjunto de su masa muscular una disminución significativa (6 %) del contenido proteico corporal (Tabla 5) (ANOVA, Tabla 14). La dieta del 20% de contenido en lactoalbúmina tendría un efecto más profundo y diferencial ya que los animales viejos sometidos a la misma presentaron una disminución del contenido proteico corporal del 14% en relación con los adultos alimentados con

esa dieta, mientras que los ratones que consumieron la dieta del 14% presentaron modificación, por lo tanto se obtuvo una interacción significativa en el análisis de la varianza que incluyó a la edad y la dieta (ANOVA, Tabla 14).

Por otra parte, tanto el peso de los músculos, el contenido proteico corporal absoluto, así como el peso de hígado y corazón, parecieron corresponderse con una forma cuasi-lineal (alométrica) con el peso del animal (Gráficos 13, 14 y 16). La relación no lineal entre peso y tasa metabólica y el desarrollo de la relación alométrica es una relación clásica del metabolismo que sin embargo no deja de ser utilizada (Suarez, Darveau y col. 2004) (Glazier 2005), ya que se puede responder mejor a sus necesidades metabólicas que simplemente al peso corporal. Así con la vejez, se encuentra que estas vísceras y componentes corporales fueron, en algún caso, de menor tamaño lo que podría señalar su menor aporte a la fisiología en comparación con la de los adultos. Por otra parte, se puede pensar también en un aumento relativo del tamaño del hígado en los adultos, lo cual tendría sentido si el hígado estuviera sufriendo algún tipo de alteración como el desarrollo de esteatosis o de hígado graso. Sin embargo, en la comparación de los grupos de ratones salinos alimentados con las dietas conteniendo lactoalbúmina con los controles de la dieta comercial no se encontraron diferencias significativas más que con el peso del corazón del grupo de los adultos alimentados con la dieta del 14% (Gráfico 3 a y b). En este sentido, más adelante se discutirá esta posibilidad.

Otra víscera, el colon, presentó un incremento significativo del peso, lo que indicaría que los ratones viejos bien incrementaron sus necesidades, o bien las dietas no suministraron los suficientes sustratos, o bien se produjeron ambas circunstancias,

esta situación pareció corroborarse dada la existencia de una correlación significativa ($R=0,633$ y $P=0,002$), entre peso de colon y valores de glucemia en los ratones viejos; y por el contrario se encuentra que los ratones maduros muestran una correlación positiva entre ingesta total y glucemia ($R=0,527$ $p=0,021$, Gráfico 9). Ello pudiera indicar que de alguna forma aquellos ratones con niveles menores de glucosa incrementarían esos niveles glucémicos mediante el incremento del tamaño del colon, incrementando la superficie de absorción de alimento. En este sentido, la comparación entre ratones viejos alimentados con dietas conteniendo lactoalbúmina y dieta comercial pareció respaldar esta hipótesis ya que los controles mostraron un peso de colon muy superior a los primeros, dado que la dieta comercial de los controles se caracterizó por ser una dieta que por su propia constitución, con muy pocos azúcares (2%) y utilización de cereales completos, por lo tanto, hidratos de carbono complejos. Ello sugiere que los controles tuvieron una menor disponibilidad de glucosa, en contraposición a las dietas con lactoalbúmina y, quizá por tanto la necesidad de incrementar su tracto gastrointestinal para incrementar sus niveles de glucemia. Por otra parte, el colon en este estudio, no se comporta presentando una relación alométrica, es decir, que su desarrollo en las etapas de madurez y vejez no se rige por los parámetros de paralelismo con el tamaño corporal, comunes en todos o la mayoría de los órganos corporales de los animales. En este sentido, si se ha estudiado la existencia de una cierta alometría de las diferentes partes del tracto gastrointestinal de los roedores (Lovegrove 2010). Por ello, sería de interés el estudio de la alometría del colon en estas condiciones experimentales para aseverar o rechazar esta hipótesis.

Perfil lipídico y estado cardiovascular

La vejez también pareció ejercer influencia en los ratones al incrementar los niveles séricos de colesterol (Orlandi, Bochaton-Piallat y col. 2006) (Costopoulos, Liew y col. 2008), mientras que la lipoproteína HDL fue menos abundante en los ratones viejos (Tabla 7) que en los adultos (Paigen, Holmes y col. 1987). Además, se encontró un incremento significativo del 15% del índice aterogénico en los ratones viejos (efecto significativo de la EDAD, ANOVA Tabla 16), éste índice también se correlacionó significativamente con el parámetro de la muerte celular de los hepatocitos ($R=0,414$ y $P=0,004$). Por el contrario, la concentración plasmática de triglicéridos se redujo en conjunto en los viejos en un 37% (Tabla 7), este resultado resulta sorprendente dada la experiencia de datos, especialmente en humanos, como con el envejecimiento se produce un incremento de los niveles de los triglicéridos (Aronow 2004) y una progresiva aterosclerosis (Sattler 2013). Por otra parte, en los ratones, es bien conocida la relación entre niveles altos de colesterol con niveles bajos de triglicéridos (Paigen, Holmes y col. 1987), lo cual podría explicar de una forma plausible los resultados del presente estudio. La concentración de proteína en la dieta sí pareció ejercer influencia, así la dieta del 20% de proteína, que por una parte indujo un incremento de los valores del HDL en todos los animales y los triglicéridos en los adultos, por otra parte llevó a una disminución en los valores de los triglicéridos de los viejos alimentados con esa dieta frente a los que consumieron la dieta del 14%. Estos resultados parecen sugerir que las dietas experimentales indujeron una serie de perjuicios en el perfil lipídico de los ratones alimentados con

las mismas. La comparación de los grupos de ratones alimentados con las dietas conteniendo lactoalbúmina en relación con los controles alimentados con la dieta comercial pareció sustentar esta hipótesis ya que los primeros mostraron incrementos significativos de los valores de colesterol, de los triglicéridos y del índice aterogénico (Gráfico 4 a, b y d). Se podría razonar, de forma similar a lo discutido en relación al colon, que las dietas experimentales proporcionaron carbohidratos purificados; en este caso diversos autores señalan que el consumo de una dieta semisintética rica en carbohidratos puede ser perjudicial sobre el perfil lipídico (Kritchevsky 1975) (Kritchevsky, Davidson *y col.* 1980) (Kushwaha y McGill 1998), si bien es cierto que en los ratones adultos sometidos a la dieta del 20% se encontró una pequeña elevación de los triglicéridos. Por otra parte también se ha relacionado el contenido en lactoalbúmina con un posible efecto aterogénico (Lopez-Oliva, Nus *y col.* 2009), por todo ello es posible que se diera una de las dos posibilidades o las dos.

En paralelo con el incremento de los depósitos grasos de los ratones viejos, que se ha discutido previamente, se observó un notable incremento (92%) de los niveles de leptina sérica (Tabla 8). Sin embargo, sorprendentemente, la ingesta de la dieta del 20% de lactoalbúmina indujo en los ratones adultos una significativa disminución de los niveles de la leptina (efecto de la EDAD, ANOVA Tabla 17), cuando, por el contrario, el consumo de esa dieta llevó a un incremento de la proporción de los depósitos grasos por encima de los alimentados con la dieta del 14%, contradiciendo en principio la relación entre leptina y proporción de grasa corporal. También pareció influir la concentración de proteína de la dieta sobre los

niveles de la concentración sérica de IGF-I de los animales viejos, de forma que los ratones que consumieron el mayor nivel (20% de lactoalbúmina) presentaron las mayores concentraciones de la hormona (30%) (Tabla 17). Esta relación entre mayor concentración de proteína en la dieta y una mayor concentración de somatomedina en sangre, sugiere, por el propio funcionamiento del eje somatotrópico y la acción secretagoga de los aminoácidos de la dieta, que la mayor cantidad de aminoácidos disponibles como sustratos podría llevar a un incremento de la liberación de la IGF-I por el incremento de la producción de GH (van Vught, Nieuwenhuizen *y col.* 2010); aunque también se han apuntado otros posibles factores metabólicos que se relacionan con la síntesis y liberación de GH, ya sea positiva o negativamente con la activación del eje somatotrópico; así se ha descrito una relación inversa entre niveles plasmáticos de triglicéridos con la síntesis y liberación de GH (Luque, Gahete *y col.* 2006).

Por otra parte, se ha relacionado la disminución de la actividad de la enzima paraoxonasa (PON1) con un incremento de un estado proaterogénico e incluso directamente patológico del sistema cardiovascular (Quemeneur, Martin-Nizard *y col.* 2007). También se ha descrito, en ratones, disminuciones de la expresión de esta enzima, no necesariamente ligadas a modificaciones en los perfiles lipídicos, y también relacionados con un incremento prooxidativo y trombogénico, asociada a inflamación vascular (Ng, Chu *y col.* 2008). Los ratones viejos alimentados con las dietas con lactoalbúmina (14 y 20%) de este trabajo presentan mayores valores de expresión de PON1 que los correspondientes ratones adultos a los que también se alimentó con estas dietas. Estos resultados, junto con los resultados discutidos hasta

el momento resultan sorprendentes, cuando precisamente los animales más viejos suelen tener mayores problemas del estado y riesgo aterogénico (Guarner y Rubio-Ruiz 2012). Para una explicación de estos resultados se debería atender a lo descrito en la literatura respecto a disminuciones de la expresión de PON1 no solo como consecuencia del deficiente estado aterogénico o prooxidativo del individuo como se ha señalado, sino también como consecuencia de sufrir otras alteraciones o patologías no directamente relacionadas con el estado aterogénico y más relacionadas con la enfermedad hepática crónica (Keskin, Dolar y *col.* 2009).

Aunque en el caso del hígado graso no alcohólico los resultados no tendrían que ser concluyentes, se puede encontrar una disminución consistente y significativa de la actividad de PON1 sérica en vacas con hígado graso, de forma que se propone como un bioindicador de esta patología (Farid, Honkawa y *col.* 2013), pero también se ha descrito un incremento compensatorio de la actividad hepática de la paraoxonasa, pero no de la plasmática, en niños (Desai, Baker y *col.* 2014). Es decir, que PON1 no sería únicamente indicativa del estado aterogénico sino que también sería sensible a otros estados patológicos, especialmente del hígado, lo cual hace que su interpretación haya de ser más cautelosa. Por ello, podría ser precisamente esta la situación que sucediera en este estudio, ya que los ratones adultos, sometidos precisamente a este tipo de dieta sufrirían un menoscabo en su metabolismo hepático lo que repercutiría en el metabolismo de PON1 y como consecuencia presentarían la citada disminución de los niveles de la actividad de la enzima. Sin embargo, esta pérdida de actividad de PON1 no parece que sea un problema procedente de una pérdida de funcionalidad de la célula hepática debida a un daño

diferente al mencionado ya que los ratones viejos muestran unos mayores niveles (14%) de lipoperoxidación hepática (LPO), así como de muerte celular hepática (81%) (Tabla 9). Es decir, los hepatocitos de los ratones viejos sufrirían mayor muerte celular y mayor lipoperoxidación (son más viejos, están más dañados), pero no sufrirían un problema de esteatosis hepática. El incremento de la LPO con la edad (35%) fue algo mayor en los animales alimentados con la dieta del 14% que la que se produjo en los que ingirieron la dieta con el 20% de lactoalbúmina (22%), También la muerte celular se incrementó considerablemente (247%) en los ratones que consumieron la dieta del 14%, pero no en los ratones alimentados con la dieta del 20%. Sin embargo, en ambos casos no se relacionó con la aparición de una interacción significativa EDADxDIETA en el análisis de la varianza (No significativo, ANOVA Tabla 18).

También, en el caso de la actividad PON1, se encontró una interacción entre el nivel proteico de la dieta ingerida y la edad de los ratones (ANOVA Tabla 17). Así, los adultos prácticamente presentaron un nivel de actividad de la enzima similar, es decir que la diferencia entre ingerir un 14%y un 20% de lactoalbúmina en la dieta no pareció tener un efecto muy profundo (Tabla 8). Por el contrario, en los viejos, que presentaron, como se ha indicado, mayores niveles de actividad PON1, la dieta del 20% pareció resultar claramente menos protectora frente a la aterogénesis ya que presentó unos valores de PON1 que fueron aproximadamente la mitad de la que se encontraron en los ratones viejos que consumieron la dieta del 14%, lo cual también se correlacionó con el resultado previamente indicado, de la menor concentración de triglicéridos en estos ratones, pero que en principio se

contradeciría con los resultados encontrados con los niveles de colesterol y HDL en el conjunto de los ratones viejos. El cálculo de la razón PON1:HDL es de utilidad en los estudios de aterogénesis y se utiliza ampliamente, aunque la interpretación que se hace de esta razón no es única ya que por una parte puede informar del nivel de HDL corregido por actividad enzimática de PON1 (Bounafaa, Berrougui y *col.* 2014) y por otra de la capacidad antioxidante del HDL (Lopez-Oliva, Nus y *col.* 2009), en cualquier caso puede proporcionar información adecuada concerniente al riesgo y a la patología aterogénica. En los adultos alimentados con las dietas conteniendo lactoalbúmina, la razón PON1:HDL resultó similar a lo expuesto para la actividad de PON1, al incorporar éste parámetro en dicha razón, ya que los adultos alimentados con las dietas que contenían lactoalbúmina como proteína presentaron unos valores paradójicos comparados con los viejos. Así, también en paralelo con la actividad de PON1, en los ratones viejos la razón PON1: HDL aumentó considerablemente (Tabla 8); sin embargo, la diferencia entre los valores de ésta razón para los ratones alimentados con las dos dietas de lactoalbúmina fue mayor que la que se encontró entre los valores de PON1. Bounafaa y *col.* (Bounafaa, Berrougui y *col.* 2014) indican que los pacientes con el síndrome coronario agudo presentan valores significativamente superiores a los controles sanos, además estos autores encontraron un menor coeficiente de correlación y se pudo comprobar una menor pendiente de las rectas de regresión entre PON1 y PON1:HDL, sin embargo en los ratones de este trabajo no se constataron diferencias de pendientes de las diferentes rectas de regresión de los grupos de ratones (datos no mostrados).

Efecto de la vejez sobre los ratones tratados con hormona de crecimiento

El tratamiento con GH tuvo como consecuencia, en primer lugar, el significativo incremento del peso (aproximadamente un 300%) en el conjunto de todos los grupos de ratones de este estudio (Tabla 2) (Efecto significativo del tratamiento, ANOVA, Tabla 11). El modo como obtuvieron esas ganancias de peso fue a través de los correspondientes incrementos de las eficacias alimentarias que globalmente fueron de un 300% superior a los controles salinos. Ese es un aspecto totalmente diferente que se obtiene cuando se produce un tratamiento exógeno con GH y que lo diferencia del que se obtiene en los animales no tratados en los que la única forma posible de aumentar el peso es a través del incremento de la ingesta. En los animales tratados con GH de este trabajo tan solo se produjo un pequeño incremento de la ingesta que fue del 5% (que no fue significativo), pero no se halló una disminución en la ingesta de alimentos en los animales viejos, como se puede encontrar en otros estudios con tratamiento de GH en edades avanzadas donde la ingesta se reduce (Malmlof, Din y col. 2002); por el contrario, en otros trabajos refieren aumento de la ingesta en animales tratados con la hormona a edades tempranas, antes de la madurez (Lopez-Oliva, Agis-Torres y col. 2000) o en humanos en los que se administra la GH a niños (Blissett, Harris y col. 2000).

Por otra parte, la administración de GH parece precisar de unos mínimos niveles proteicos en la dieta o por lo menos parece existir la evidencia de que hay unas determinadas proteínas o aminoácidos que sean más capaces de influir sobre el eje somatotrópico y cuando no es así no solo no se obtienen resultados neutros sino que pudieran obtenerse resultados negativos (van Vught, Nieuwenhuizen y col. 2010).

En el presente estudio los ratones adultos tratados con GH y alimentados con la dieta del 14% de lactoalbúmina, pudieron mostrar deficiencias e incapacidad para suministrar un aporte adecuado de nutrientes y/o sustratos en algunos casos, como por ejemplo pudiera haber sucedido con la eficacia alimentaria de los ratones adultos, que fue menor que los controles salinos. Por el contrario, los ratones alimentados con la dieta del 20% de lactoalbúmina si parecieron mostrar en todo momento unos resultados óptimos en ganancia de peso y en eficacia alimentaria, ya fueran adultos o viejos.

El aumento de peso por aumento de la masa magra no parece posible en los animales maduros o viejos no sometidos a un tratamiento especial: en la madurez y más aún en la vejez, en condiciones normales, no se produce un desarrollo corporal con posterioridad, dado que el normal, fisiológico, ha tenido lugar en todos los animales hasta la madurez (Agis-Torres, Lopez-Oliva *y col.* 2002). En cambio lo que sí puede encontrarse es una disminución de la masa magra (Yu, Masoro *y col.* 1982) en beneficio de la masa grasa (Bluher 2008) (Berryman, Christiansen *y col.* 2008). La pérdida de masa magra puede potenciarse si el suministro de nutrientes es menor de las necesidades para un adecuado mantenimiento del recambio fisiológico corporal, circunstancia que se suele producir por la anorexia del envejecimiento (Chapman 2004). Sin embargo, parece que sería posible realizar acciones que podrían contrarrestar los efectos del envejecimiento y lograr el mantenimiento de la masa magra como ejercicio, etc. Por otra parte, otros tratamientos como el tratamiento con GH suele inducir una disminución de los depósitos grasos así como un incremento de la masa magra en humanos (Yuen y Dunger 2006) (Moller y

Jorgensen 2009) y en animales (Berryman, Christiansen *y col.* 2008) (Bartke, Sun *y col.* 2013). Es precisamente la modulación del mantenimiento de esa proporción proteína/grasa uno de los objetivos de este estudio por su interés el conocer el efecto del tratamiento sobre animales viejos, especialmente para el tratamiento de ancianos para su posible translación y el beneficio que se podría obtener de ello (Bluher 2008).

El efecto diferencial del tratamiento hormonal sobre el incremento de la masa magra a través del estudio del contenido en proteína corporal, la razón proteína/grasa en el conjunto de los grupos de ratones tratados con GH frente a controles salinos, independientemente de su edad o dieta con lactoalbúmina administrada, se mostró muy significativo. Así, se evidenció la existencia de diferencias significativas en la proteína corporal absoluta, así como en la relación proteína/grasa. Este último parámetro aumentó un 17% en los ratones tratados con GH, y en el análisis de la varianza el factor TRATAMIENTO fue muy significativo ($P=0,006$), lo que señaló la magnitud del efecto del tratamiento en la distribución de los sustratos hacia el depósito de proteína corporal (ANOVA Tabla 14). Por otra parte, en el grupo de los adultos alimentados con la dieta de menor contenido proteico (14% de lactoalbúmina) se alcanzó también un 25% de diferencia de proteína corporal (Tabla 5) lo que señala la eficacia de la GH en el aprovechamiento de sustratos para el depósito proteico (Vann, Nguyen *y col.* 2000). También ello sugiere que la dieta del 14% de lactoalbúmina fuera una dieta satisfactoria para la edad madura y el mayor nivel proteico de la dieta (20% de lactoalbúmina) pudiera resultar un nivel excesivo, ya que no se consiguió un mayor incremento de la masa magra; sin

decrementos de la masa grasa en adultos tratados con GH e incluso incrementos en ratones viejos tratados con GH frente a los animales tratados alimentados con el 14% en los diversos depósitos grasos (interacción significativa para proteína corporal y depósitos grasos, EDADxTRATAMIENTOxDIETA, ANOVA Tablas 12 y 14) (Tablas 3 y 5). El origen de esos incrementos grasos podría atribuirse a varias causas, como a un paradójico aumento de actividad del eje somatotrópico con efecto contraproducente, así Bartke y colaboradores señalan que unos ratones con un exceso de producción de GH pueden mostrar 2,1 veces más masa grasa que los controles (Bartke, Sun *y col.* 2013). No se encontró un efecto tan marcado sobre la masa muscular, o por lo menos sobre todos los músculos que se han tomado muestras en este trabajo. En realidad no es un resultado que sorprenda: son animales en los que el desarrollo ya terminó tiempo atrás (adultos) o incluso están en una etapa de la vida en la que se espera que pueda existir regresión corporal o de las funciones fisiológicas (viejos) debido a la somatopausa (Sattler 2013). Los efectos de la GH sobre la acreción proteica corporal no parecen ser discutidos (Chikani y Ho 2014) (Birzniece, Nelson *y col.* 2011), no sucede así con otros efectos funcionales que son más discutidos, pero es posible que la GH pueda ejercer un efecto de incremento de mejora de la fuerza y de la capacidad muscular (Tavares, Micmacher *y col.* 2013), que también evitaría la pérdida de masa magra asociada a la vejez (Brioché, Kireev *y col.* 2014) y ello podría ser uno de los factores que podrían explicar cómo los animales tratados con GH de este estudio presentaron un incremento de aquellos músculos que son más ejercitados en las condiciones experimentales como son cuádriceps y gastrocnemio (Tabla 4) (Efecto significativo del TRATAMIENTO, ANOVA Tabla 13). También Malmlöf y Johansen (Malmlof y

Johansen 2003) encontraron un incremento del peso del cuádriceps de ratas viejas tratadas con rhGH, independientemente de la dieta suministrada. A este respecto se ha comprobado en ratones maduros la acción anabólica hipertrófica de la GH exógena a través del eje somatotrópico, ya que es necesaria la acción de la IGF-I (Kim, Barton *y col.* 2005).

La presencia y la concentración de lactoalbúmina de la dieta parece evidenciarse como un factor crucial, y que parece intervenir de un modo muy diferente dependiendo de la edad de los ratones a los que se suministró dichas dietas. En primer lugar, las dietas con lactoalbúmina derivaron los sustratos con preferencia hacia grasa en los adultos, ya fueran tratados con GH como salinos, en comparación con lo encontrado en el grupo alimentado con dieta comercial control, mientras que en los ratones viejos no se pudo encontrar esa diferencia entre las dietas (Gráfico 2e). En segundo lugar, en relación con la concentración de proteína (lactoalbúmina), ya que como se ha discutido previamente el nivel del 14% de lactoalbúmina pudiera ser en determinados aspectos deficitario o no cumplir las expectativas de una buena provisión de sustratos. También el nivel del 20% de lactoalbúmina en la dieta en algunos casos pudiera resultar excesivo, al menos tal como se ha discutido previamente en los grupos de ratones no tratados ya que les lleva a un notable aumento de su masa grasa. Por otra parte, la administración de GH volvería a cambiar las necesidades de los ratones, y así los animales viejos alimentados con la dieta con el 14% de lactoalbúmina serían afectados negativamente dado el incremento de la grasa abdominal que presentan y de la que es conocida su relación positiva con el estado aterogénico en humanos (Munzer, Harman *y col.* 2001); sin

embargo, los ratones viejos alimentados con la dieta con el 20% de lactoalbúmina presentaron igualmente un incremento de la grasa abdominal, con lo que se podría pensar en que este nivel proteico, que en otras etapas de la vida puede ser idóneo por su mantenimiento de un adecuado suministro de nutrientes, pudiera no serlo en la vejez. Sin embargo, y a pesar de ello, pudiera ser más conveniente el pequeño exceso de la dieta del 20% que el defecto de la dieta del 14%; en cualquier caso podría ser conveniente realizar estudios más detallados con niveles de porcentaje de proteína intermedios. Los estudios clásicos de Toyomizu y colaboradores sobre los niveles proteicos adecuados en la dieta de ratones, en este caso no sometidos a tratamientos específicos, sino que se les administraron dietas que diferían en su proporción en proteína (Toyomizu, Hayashi y *col.* 1988) (Toyomizu, Kimura y *col.* 1989), eran bastante claros al respecto en sus conclusiones: “la concentración óptima de proteína en la dieta depende de la variable que se quiere maximizar (entendiendo está por si se busca más acúmulo de energía o de masa magra, por ejemplo) y cuando (es decir, la etapa de la vida)”. Estos autores también corroboran con sus resultados el hecho de que los animales presentan las mayores diferencias a lo largo de la vida en composición corporal en el depósito graso, además que, para los ratones con las edades más avanzadas hay mayor tendencia al acúmulo energético (graso) especialmente si la dieta es baja en proteína.

Un problema con los estudios nutricionales ha sido el corto espacio temporal de los mismos; también se podría mencionar que su atención se centra básicamente en las primeras etapas de la vida, el desarrollo o las primeras etapas del periodo adulto. Los trabajos centrados en la vejez son muy escasos por su dificultad y complejidad,

aunque no hay ausencia de ellos y recientemente también se están planteando algunos trabajos como el de Solon-Biet y colaboradores que se basa en el mismo principio de Toyomizu y colaboradores aunque se desarrolla aproximadamente 30 años más tarde y el centro de atención también cambia a otro tipo de cuestiones que preocupan en la actualidad como son la longevidad (Solon-Biet, Walters *y col.* 2015). Sin embargo, los resultados que obtienen estos autores no se contradicen con los de Toyomizu, ni con los del presente estudio de esta tesis.

El tratamiento con la hormona rhGH también llevó a los ratones a un incremento significativo de los pesos de hígado (24%) y corazón (11%) (Tabla 6), lo que pudiera señalar el incremento del metabolismo y de las necesidades metabólicas de estos animales. A este respecto Liu y LeRoith (Liu y LeRoith 1999) encontraron que la administración exógena de GH en ratones incrementó el peso del hígado de ratones, mientras que Prysor-Jones y Jenkins (Prysor-Jones y Jenkins 1980) describieron el incremento tanto del peso del hígado como del corazón en ratas que presentan hiperproducción de GH. Por otra parte, la dieta pareció ejercer un efecto diferencial por edad ya que fueron los adultos alimentados con el 14% de lactoalbúmina los que presentaron mayor incremento del hígado (62%) y los viejos alimentados con el 20% de lactoalbúmina el mayor incremento de corazón (41%) frente a sus respectivos controles salinos. En relación a la comparación entre la alimentación con lactoalbúmina y con dieta comercial (controles), es de destacar una tendencia generalizada a un mayor peso de los órganos, con presencia de diferencias significativas en algunos grupos de ratones tratados con GH y alimentados con

lactoalbúmina frente a la dieta control, salvo en el caso del colon que como se señaló presentó mayor desarrollo en los controles viejos (Gráficos 3 a, b y c).

Estado lipídico y cardiovascular

El tratamiento con rhGH llevó al conjunto de los grupos de ratones de este estudio a mostrar unos mayores niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos y lipoproteína HDL (Tabla 7) (Efecto significativo del TRATAMIENTO, ANOVA Tabla 15). Por lo que respecta a los triglicéridos ello parecería estar en contradicción con los resultados que se pueden esperar en los tratamientos habituales en los que se someten a tratamiento con rhGH exógena a pacientes humanos con deficiencia de GH en los que se encuentra una reducción de los mismos (Sattler 2013), si bien estos mismos pacientes muestran un mal control glucémico, en lo cual también se encuentra discrepancia con los resultados encontrados en el presente trabajo, se puede deducir que ni las circunstancias iniciales ni las consecuencias son las mismas. En cualquier caso, la complejidad de la relación entre GH, IGF-I, además de sus receptores y los otros factores del estudio podría hacer pensar que la traslación de resultados en humanos no parece ser completamente adecuada.

En los ratones adultos tratados con rhGH, la ingesta de las dietas con lactoalbúmina pareció ejercer un efecto diferencial, ya que el mayor nivel proteico (20%) llevó a los ratones a un incremento significativo y considerable del colesterol del 72%, y de los triglicéridos de casi el 60%, frente al menor nivel proteico (14%) (Tabla 7), señalando en principio a la primera dieta como más proaterogénica que la segunda.

Sin embargo, también se incrementó significativamente en un 25% las lipoproteínas HDL en este grupo de ratones adultos tratados con GH y alimentados con el 20% de lactoalbúmina frente a los ratones alimentados con la dieta del 14% de lactoalbúmina, lo cual supuso un pequeño contrapunto a la tendencia aterogénica de dicho nivel proteico (Tabla 7) (Efecto significativo del TRATAMIENTO y de la interacción de la EDAD el TRATAMIENTO y la DIETA (ANOVA Tabla 15). En cualquier caso las dietas con lactoalbúmina mostraron mayor tendencia al incremento de los niveles séricos de colesterol e índice aterogénico en ratones adultos y viejos, tratados y no tratados frente a controles alimentados con dieta comercial (Gráficos 4a, b y d). Aunque por lo que respecta a la administración exógena de GH y la modificación de los niveles de la lipoproteína HDL los resultados publicados son contradictorios ya que se encuentran disminuciones (White, Schaefer y *col.* 1983) pero también se han descrito el aumento de dichos niveles (Garry, Collins y *col.* 1996), adicionalmente se han relacionado dichos niveles con la acción de las hormonas sexuales (Bansch, Dirkes-Kersting y *col.* 1997); también la comparación con los controles alimentados con la dieta comercial arrojó resultados variables en relación con los valores de HDL (Gráfico 4c).

Por otra parte, se encontró que los niveles séricos de leptina se mostraron elevados en los grupos de ratones viejos tratados con GH y alimentados con la dieta con el 20% de lactoalbúmina (Tabla 7). Por el contrario, se encontraron niveles bajos de leptina en los grupos de ratones tratados con GH y alimentados con la dieta del 14% de lactoalbúmina (Tabla 7). Estos comportamientos diferenciales dieron lugar a la

aparición de interacciones significativas EDADxTRATAMIENTO, EDADxDIETA y TRATAMIENTO x DIETA en el análisis de la varianza (ANOVA Tabla 17).

La leptina se secreta, en individuos sanos, preferentemente por el tejido adiposo, entre otras adipoquinas (Fasshauer y Bluher 2015). Se ha propuesto que la leptina puede estar sujeta a diferentes tipos de interrelaciones más o menos complejas con la secreción de GH, e incluso la posibilidad de una regulación por bucles de retroalimentación (White, Ahmad y col. 2003). En cualquier caso, ya sea directamente o indirectamente de la relación que hubiera podría estar condicionada también con el nivel proteico de la dieta. Una interpretación que se ha publicado previamente es la posibilidad de que la administración de GH pudiera determinar una disminución del tamaño crítico del adipocito en su producción de leptina y ello conducir a un incremento de la ingesta alimentaria (Lissett, Clayton y col. 2001) (Lopez-Oliva, Nus y col. 2009). Por ello, el nivel proteico de la de dieta y la edad en la que se produjo el tratamiento parece que determinó de una forma drástica el resultado que se obtuvo de dicha administración exógena de rhGH. Así, mientras que los ratones viejos alimentados con la menor concentración de lactoalbúmina en la dieta (14%) obtuvieron una mejora de su estado aterogénico, lo cual está en consonancia con otros estudios similares (Laursen 2004) (Lopez-Oliva, Nus y col. 2009), los animales adultos alimentados con ese mismo tipo de dieta sorprendentemente mostraron un perfil claramente peor (Lopez-Oliva, Nus y col. 2009). Este resultado sustentaría la idea de que la dieta con un contenido del 20% de lactoalbúmina, siendo adecuada para otras etapas de la vida, sin embargo pudiera

resultar excesiva para los requerimientos nutricionales de los ratones más viejos y por tanto constituir un elemento deletéreo en la salud del animal viejo.

En el caso de los niveles séricos de JGF-I no se obtuvieron diferencias destacables entre los grupos alimentados con las dietas conteniendo lactoalbúmina (Tabla 8). Sin embargo sí se pudo comprobar una mayor tendencia de dichos grupos para mostrar concentraciones superiores de dicha hormona frente a los grupos de controles alimentados con la dieta comercial, que en algunos grupos resultó significativa (Gráfico 5c). Ello se explica gracias a la composición diferencial en aminoácidos de las dietas con lactoalbúmina ya que produciría un incremento de la producción endógena de GH, como se ha comprobado experimentalmente (van Vught, Nieuwenhuizen *y col.* 2010).

Por otra parte, por lo que respecta a actividad de la enzima PON1, con el tratamiento con la hormona rhGH se ha podido comprobar en el presente trabajo un significativo incremento de la expresión de esta enzima, de aproximadamente un 60% en los ratones tratados con la hormona frente a los ratones controles no tratados (Tabla 8). Ello, dado que se relaciona el incremento de la actividad de PON1 con una mejora del estado antiaterogénico, sugiere que el tratamiento hormonal podría ejercer un efecto positivo en este sentido (Lopez-Oliva, Nus *y col.* 2009). Sin embargo, estos resultados no son concluyentes, según Cheng y Klaassen (Cheng y Klaassen 2012) ya que se obtendría precisamente el resultado contrario cuando se administra GH exógena con un patrón pulsátil en ratones C57BL/6 al final de la pubertad, pero no en la madurez o en la vejez. Por otra parte, se obtuvieron buenos resultados globales con ambas dietas, aunque la edad determinó diferencias significativas notables. Así,

los ratones adultos tratados con rhGH se vieron beneficiados por la dieta con alta concentración en proteína (20%), ya que cuando se alimentó a los animales con el menor nivel proteico (14% de lactoalbúmina) se obtuvo un resultado mucho menor para la expresión de esta enzima (un 126% superior a los salinos) que cuando se alimentó a los ratones con el 20% de lactoalbúmina (un 302% superior a los salinos) (Tabla 8), lo que se señaló también por la interacción significativa de los factores TRATAMIENTO y DIETA en el análisis de la varianza (ANOVA Tabla 17). Por otra parte, en los ratones viejos tratados con rhGH, los que consumieron la dieta del 14% mostraron unos niveles de expresión de PON1 significativamente menores a los ratones controles salinos (22% de disminución, Tabla 8). Además, el tratamiento con GH y el consumo de la dieta del 20% de lactoalbúmina condujo al grupo de ratones correspondiente a un incremento del 77% de los niveles de expresión de PON1 frente a sus controles salinos (Tabla 8). Es decir, que se encontraron varios niveles de interacción entre los factores tratamiento, edad y dieta, (ANOVA Tabla 17) lo cual pudiera incidir nuevamente en la sugerencia del adecuado ajuste entre estos factores a la hora de una adecuada programación nutricional en las diferentes etapas de la vida, ya que no parecen ser comparables en ningún caso ni justificables la edad madura con la vejez, ni por tanto los ajustes nutricionales para uno y otros.

Por lo que respecta a la razón PON1: HDL no se encontraron diferencias tan grandes en los valores entre los grupos de ratones tratados con rhGH como las encontradas en el caso de la expresión de PON1 (Tabla 8). Por otra parte, el análisis del gráfico de la regresión lineal señaló la existencia de unos valores iniciales de PON1 elevados para los ratones tratados con rhGH en relación con los ratones salinos, manteniendo

una pendiente mayor para todo el rango de ésta razón (Gráfico 22), precisamente dependiendo de los valores iniciales y finales. Sin embargo, no se pudo comprobar una diferencia de comportamiento de las regresiones lineales como señalan Bounafaa y cols. (Bounafaa, Berrougui y col. 2014), lo que indica que en los ratones en estudio hubo diferencias en el grado pero no en la forma en cómo se comportó dicho índice.

Las modificaciones por el tratamiento exógeno con rhGH en LPO o la muerte celular, solamente se pudieron observar comparando con las dietas suministradas y para las diferentes edades (Tabla 9). Así, la disminución de LPO fue similar para los adultos que consumieron las dietas con lactoalbúmina, por efecto del tratamiento con rhGH frente a los controles salinos (aproximadamente un 26%), y viejos tratados con rhGH alimentados con la dieta del 14%, mientras que los viejos tratados con rhGH y alimentados con 20% experimentaron un efecto de mayor descenso de LPO de aproximadamente el 40%. Es decir que en los animales experimentales el tratamiento hormonal pareció tener un efecto beneficioso sobre la lipoperoxidación de los hepatocitos, y este tratamiento pareció potenciarse en los ratones más viejos cuando se les suministró una dieta de alto contenido en lactoalbúmina. En cambio, el tratamiento con rhGH llevó a incrementos notables del índice de muerte celular en todos los grupos respecto a los controles salinos, presentando en todos los grupos tratados con GH incrementos por encima del 100%. Sin más pruebas realizadas sería probable que el incremento de dicho índice se pudiera haber debido a un incremento del recambio celular e incremento de la apoptosis celular

Efectos deletéreos de las dietas con lactoalbúmina

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo llevaron a pensar que los adultos de los ratones sometidos a las dietas experimentales que contenían lactoalbúmina en distintas concentraciones (14 y 20%) podrían haber sufrido problemas precisamente debidos a las dietas suministradas.

Estos efectos deletéreos, como se han discutido previamente, consistieron en dos tipos claramente diferenciados y probablemente no relacionados entre ellos, que fueron: un efecto aterogénico con diversos matices y un efecto esteatogénico hepático.

A continuación, en esta discusión, se procederá al análisis de ambas circunstancias y los estudios que se llevaron a cabo para intentar dilucidar la naturaleza de estos efectos. En primer lugar se revisaran tanto las dietas experimentales como la dieta de control que se emplearon para poder contrastar si efectivamente fueron las dietas el origen de dichos efectos. Posteriormente se estudian los posibles factores dentro de esas dietas para que puedan originar esos comportamientos. Finalmente, se incluyen y estudian las evidencias de los citados efectos negativos de las dietas experimentales que contenían lactoalbúmina.

Dietas experimentales

Las dietas experimentales con lactoalbúmina utilizadas tienen origen, con modificaciones posteriores, de las recomendaciones para dietas experimentales

AIN-93 (Reeves, Nielsen y col. 1993), que a su vez estuvieron basadas en las experiencias previas de las dietas AIN-76, para normalizar y reducir la variabilidad entre los diferentes experimentos en materia de nutrición con roedores. Surgieron estas dietas, precisamente, debido al hecho comprobado de que la utilización de dietas basadas en cereales o en ingredientes naturales eran mucho más variables en sus resultados (Reeves, Nielsen y col. 1993).

Ya en su exposición de los estándares de las dietas Reeves y colaboradores señalaban la posibilidad de que no siempre pudieran ser adecuadas estas recomendaciones y dejaban en manos de los investigadores la responsabilidad de su utilización. Dentro del estándar citado se diferenciaban entre dietas de crecimiento (AIN93G) y de mantenimiento (AIN93M), dependiendo del periodo experimental en el que se fuera a someter al animal al experimento por el que se administrara la dieta correspondiente. Se asume, por estos autores, una dieta como ideal para los periodos relacionados con el crecimiento, gestación, y lactación (AIN93G), y además, se incluye una formulación (AIN93M) para el mantenimiento de roedores adultos (14% caseína, 12% proteína). Sin embargo, no se consideran propiamente a los animales viejos y se asumiría que consumieran el mismo tipo de dieta de mantenimiento que consumen los roedores maduros. Por otra parte, posteriormente, también se ha contemplado la modificación por utilización de diferentes tipos de proteínas y entre ellas se encuentra la albúmina y la lactoalbúmina como diferentes posibilidades comerciales estándar (dietas #110754 y #110954, Dyets Inc. EE.UU.), es decir que las dietas utilizadas en este experimento

se formularon dentro de los estándares de lo que se podría denominar dietas experimentales..

Dieta comercial control

Para comprobar esta posibilidad, se utilizó un grupo de ratones con una alimentación con dieta control de las mismas edades, adultos y viejos, y sometidos a los mismos tratamientos que los grupos de ratones experimentales.

La dieta comercial control de mantenimiento que se empleó (dieta de mantenimiento de ratas/ratones A04, Panlab, Barcelona, España) fue la que se utiliza habitualmente en el Animalario de la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, tal como se indica igualmente en la sección de Material y Métodos de esta tesis doctoral.

Estos grupos de ratones que consumieron dieta de control comercial no mostraron los problemas encontrados en aquellos ratones que fueron sometidos a las dietas experimentales con lactoalbúmina. La dieta consumida por estos grupos de control formulada por la firma comercial con un 12% de proteínas que proceden de dos fuentes: proteínas de pescado en un 4% y proteínas vegetales (soja, levadura) en un 8%; mientras que presenta un contenido en cereales, salvado y harinilla del 83,9%. En la composición centesimal del alimento se tiene según indicación del fabricante: 16% de proteínas, 3% lípidos, 4% fibra, un 60% glúcidos de los cuales solo hay un 2% de azúcares. Como se puede comprobar hay diversas características diferenciales de esta dieta de mantenimiento comercial con la dieta experimental.

Básicamente, proceden esas diferencias del empleo de materia prima precisamente menos purificada, es decir fuentes próximas a los alimentos comunes: cereales, pescado, soja, etc.

Posibles efectos adversos de las dietas experimentales

Como se ha señalado, resultó necesario determinar la causa o causas por las que se pudo producir los efectos negativos en los ratones sometidos a las dietas experimentales.

Tipos de proteínas de las dietas y aterogénesis

Los tipos de proteínas recomendadas en las versiones iniciales de AIN93 son de origen exclusivamente animal y con total ausencia de proteína vegetal, y por tanto carecen de fitoestrógenos y de otros fitoquímicos que aparecen en las dietas que incorporan fuentes alimentarias vegetales (Pellizzon 2008) (Thigpen, Setchell *y col.* 1999); modificaciones comerciales posteriores de AIN93 sí contemplaron la posibilidad de utilizar como fuente de proteínas las de origen vegetal como soja o gluten (Dyets Inc. EE.UU.). Sin embargo, la presencia de fitoestrógenos no sería necesariamente siempre deseable o por lo menos también se ha puesto en duda por su posible efecto hormonal estrogénico y sus posibles efectos deletéreos (Thigpen, Setchell *y col.* 1999). En el presente trabajo, sin embargo, los resultados parecen señalar a que la dieta suministrada, sin fitoestrógenos y con proteína animal, se

comportaría como proaterogénica y la utilización de unos componentes purificados en su elaboración, además de la ausencia de proteínas vegetales sugiere que llevarían hacia ese comportamiento sobre la salud cardiovascular (Pellizzon 2008), también se ha descrito el posible efecto negativo en ese sentido de la salud cardiovascular de una dieta basada en la lactoalbúmina frente a otro tipo de dietas (Lopez-Oliva, Nus y col. 2009). Además del efecto beneficioso de los fitoquímicos también se ha señalado a la acción de la diferente composición entre las dietas basadas en proteínas de origen animal que se considera que pueden originar hipercolesterolemia y aterosclerosis, frente a las que contienen otro tipo de proteínas como las vegetales con una menor razón lisina:arginina como la que se encuentra en la proteína de soja, con efectos antagónicos sobre las patologías cardiovasculares (Sanchez, Rubano y col. 1988) (Ni, Tsuda y col. 2003). También Blair y colaboradores indican que en el hámster alimentado con caseína o con lactoalbúmina se presenta un mayor nivel de lipoproteínas LDL-colesterol y aterosclerosis frente a aquellos animales alimentados con proteína de soja (Blair, Appt y col. 2002), además que el efecto es mayor para los animales de sexo masculino, estos autores atribuyen el efecto a la presencia de los fitoestrógenos. Por tanto, se propondrían con preferencia este tipo de proteínas por sus posibles beneficios para la salud, aunque todavía no estarían resueltos todos los aspectos sobre los alimentos antihipercolesterolémicos y antioxidantes (Saita, Kondo y col. 2015).

Además del tipo de proteína y de la presencia de fitoquímicos, un tercer factor nutricional podría haber tenido importancia en los efectos de las dietas

experimentales sobre los animales en estudio sometidos a estas dietas fueron los hidratos de carbono, tanto la cantidad como la calidad de los mismos, ya que a pesar de incorporar almidón (de maíz) y fibra también incorpora sacarosa (un 10%); son productos muy refinados con índice glucémico alto y con capacidad para promover un incremento de aterogénesis y diabetes (Liu 2002) (Maki y Phillips 2015).

En definitiva, *per se*, cualquiera de estos factores podría determinar una tendencia hacia un estado favorable a la aterogénesis. Si ello es así, parecería que cualquiera de los factores o la suma o la circunstancia producida por la interacción entre los mencionados factores nutricionales: alto nivel de hidratos de carbono purificados, lactoalbúmina, ausencia de fitoquímicos podrían haber dado lugar o potenciado dicho efecto.

Además en las etapas de la vida del estudio, esto es madurez y vejez, el efecto podría desencadenar una respuesta negativa más profunda. A este respecto conviene recordar que AIN93 fue inicialmente una dieta recomendada para determinados periodos de vida de los roedores y deja en el aire la conveniencia de su utilidad en otras (Reeves, Nielsen y *col.* 1993). Ello es relevante si se atiende a la posible traslación de resultados a la población humana, que en muchas ocasiones y cada vez con más frecuencia, parece orientar su alimentación hacia fuentes de sustratos hidrocarbonados muy purificados y proteínas de origen lácteo, por ello fuera conveniente ampliar el estudio de la posible interacción de ese tipo de alimentación con nutrientes purificados y su efecto sobre la salud cardiovascular en la vejez.

Posible estado de esteatosis hepática mediada por las dietas experimentales

Evidencias de alteración hepática

En este trabajo se constató la aparición de una serie de signos compatibles con un estado de alteración hepático en los ratones adultos, pero no en los viejos, que fueron sometidos a la ingesta de las dietas experimentales con lactoalbúmina. Tampoco aparecieron esos signos en los animales alimentados con la dieta de mantenimiento comercial. En cualquier caso, se tuvo en cuenta que: 1) la causa pareció provenir de las dietas experimentales y 2) afectó diferencialmente a ratones adultos y viejos.

Para llegar a la comprobación de esas posibilidades también se tuvieron en cuenta una serie de circunstancias. En primer lugar, los animales adultos mostraron una disminución significativa (86%) de la actividad PON1 comparada con la que presentaron los viejos (Tabla 8). Ello resultó sorprendente, teniendo en cuenta la mayor tendencia a sufrir aterosclerosis con la vejez y dada la relación de la actividad de dicha enzima con el estado aterogénico y el empeoramiento de dicho estado con la vejez. Es decir, que precisamente los viejos tendrían que haber mostrado valores menores de PON1 que los adultos, cuando precisamente fue lo contrario. Entre las posibles explicaciones para una disminución de la actividad de PON1 se ha descrito que los pacientes con diversas alteración hepáticas crónicas presentan esta característica (Keskin, Dolar y col. 2009), e incluso recientemente se ha propuesto su validez precisamente como indicador de hígado graso en animales (Farid, Honkawa y col. 2013). Por otra parte el efecto aterogénico de las dietas con lactoalbúmina tal como se ha discutido previamente podría haber sido también

inductor de alguna forma de la alteración hepática. Sin embargo, en vista de lo expuesto no pareció verosímil que ésta última fuera la causa de la disminución de la actividad de PON1 en los adultos frente a los viejos alimentados con dichas dietas.

En segundo lugar, se realizó un examen microscópico de cortes histológicos del hígado (Imágenes 1-6). Se pudo comprobar que los ratones adultos alimentados con las dietas experimentales que contenían lactoalbúmina en los dos niveles de proteína (14 y 20%), presentaban infiltraciones grasas muy significativas en los hepatocitos (dietas 14% y 20%, Imágenes 1a y b). Por el contrario, en los ratones viejos a los que se suministraron las mismas dietas mostraron una ausencia de dichas infiltraciones grasas en los hepatocitos de las preparaciones histológicas correspondientes (dietas 14% y 20%, Imágenes 2^a y b). Por otra parte, los cortes histológicos de ratones adultos y viejos pero alimentados con la dieta comercial de mantenimiento (control) mostraron un parénquima hepático normal, con ausencia de las alteraciones mencionadas (Imágenes 5 y 6). Es decir, que pareció haber suficiente evidencia para sugerir que la ingesta de las dietas con lactoalbúmina, precisamente en el periodo de edad de los 6 meses y no de los 18 meses indujo en los animales algún tipo de alteración hepática de hígado del tipo esteatosis hepática o hígado graso no alcohólico (Buque, Aspichueta y col. 2008). No es posible ofrecer en este momento una explicación mucho más contrastada de ese comportamiento diferencial por la edad que la posibilidad de una relación con el nivel del metabolismo, más ralentizado en el viejo y que de alguna forma hace que no se vea afectado por la imposición del efecto deletéreo de la dieta. En este sentido, los ratones viejos presentaron un desarrollo de colon mayor, como se discutió

previamente, señalando quizá la posibilidad de una mayor necesidad de aprovechamiento de los alimentos y quizá unos menores problemas en los momentos de esos aprovechamientos.

Por otra parte, la administración exógena de rhGH pareció llevar a una disminución significativa de la infiltración grasa en el tejido hepático de los diferentes grupos de ratones en estudio, independientemente de la dieta que consumieran e independientemente de la edad de los mismos, contrarrestando, por tanto, el aparente efecto inductor deletéreo encontrado en los animales adultos alimentados con las dietas experimentales conteniendo lactoalbúmina (Imágenes 3-4). A este respecto hay que hacer notar la extensa y sólida evidencia acerca de la reversión de la enfermedad de hígado graso no alcohólico que se consigue terapéuticamente desde algunos años mediante la administración exógena de GH (Takahashi, Iida y *col.* 2007), aunque recientemente se está contemplando el tratamiento no solo de aquellos pacientes GH-deficientes, sino también de los que padezcan alteración hepática independientemente de su origen (Matsumoto, Fukuoka y *col.* 2014). Es decir, el beneficio en el tratamiento de la enfermedad de hígado graso no alcohólico con GH no dependería, evidentemente, del origen multifactorial de dicha patología y en cualquier caso, como señalan los diferentes autores desde que se comenzó a administrar GH para su tratamiento, se consigue resolver dicho estado que puede derivar a estados patológicos de mayor gravedad como cirrosis, etc.

Por todo ello se puede sugerir con bastante verosimilitud las aseveraciones acerca del efecto deletéreo de la dieta sobre el hígado que se han ido discutiendo en este trabajo. Sería conveniente determinar con precisión la naturaleza de dicho efecto y

las consecuencias, así como la posibilidad de que un efecto similar pudiera afectar a los adultos y ancianos.

7 CONCLUSIONES

- 1) La influencia de los factores EDAD, TRATAMIENTO y DIETA sobre los parámetros estudiados en los ratones BALB/c adultos y viejos, tratados con rhGH y salinos, alimentados con ambas dietas con lactoalbúmina fue variable, pero aunque la EDAD y el TRATAMIENTO fueron los factores más significativos, la DIETA también influyó sobre el perfil lipídico presentó interacciones con los otros factores.
- 2) La razón proteína/grasa corporal fue el mejor indicador para conocer la utilización de sustratos de la dieta por los ratones en estudio.
- 3) El tratamiento con rhGH incrementó significativamente el peso corporal y la ganancia de peso, así como la masa magra de todos los ratones, adultos y viejos, a través del incremento de la eficacia alimentaria y direccionando los sustratos hacia masa magra. El nivel proteico del 14% pareció suministrar un nivel adecuado de sustratos ya que el índice proteína/grasa fue más favorable que el que presentaron los ratones que ingirieron la dieta del 20%, aunque los pesos corporales de los primeros fueran inferiores.
- 4) El nivel proteico del 20% de lactoalbúmina pareció resultar excesivo en la dieta de los ratones viejos salinos ya que les llevó a un mayor depósito graso y una razón proteína/grasa desfavorable, así como también en los ratones tratados con rhGH, ello parece sugerir la necesidad de ajustar con mucha precisión el nivel proteico de la dieta en animales o humanos en tratamiento hormonal.
- 5) La ingesta de dietas con lactoalbúmina se mostraron proaterogénicas en los ratones BALB/c. En los ratones adultos además del efecto aterogénico se encontraron una serie de alteraciones compatibles con un cuadro de

esteatosis hepática; por el contrario, la ingesta de estas dietas no pareció afectar el estado hepático de los ratones viejos en las mismas condiciones experimentales.

- 6) La actividad sérica de la enzima paraoxonasa (PON1) que originariamente se propuso como índice de riesgo aterogénico y oxidación lipídica resultó modificada por la alteración hepática mediada por la ingesta de las dietas con lactoalbúmina en determinadas circunstancias.
- 7) La administración exógena de rhGH a los ratones BALB/c adultos alimentados con ambas dietas con lactoalbúmina pareció revertir la alteración hepática y aumentar significativamente la actividad sérica de la enzima paraoxonasa (PON1), mejorando, por tanto, el perfil lipídico de los ratones en estudio.

8 ABREVIATURAS

A- Ratones adultos de 6 meses de edad

CA- Ratones control (salinos) adultos (6 meses)

CC- Ratones con dieta control

CV- Ratones control (salinos) viejos (18 meses)

DNA- Ácido desoxirribonucleico

GH- Hormona de crecimiento

GHBP- Proteínas transportadoras de la hormona de crecimiento

GHR- Receptor de la hormona de crecimiento

GHRH- Hormona liberadora de la hormona de crecimiento

HDL- Lipoproteínas de alta densidad

IGF-1- Factor de crecimiento de la insulina 1

IGFBP- Proteínas transportadoras de IGF-1

IA- Índice aterogénico

IP- Ingesta proteica

IT- Ingesta total

LPL- Lipoproteínas de baja densidad

LPO- Lipoperoxidación

PCD- Muerte celular programada

PON1- Paraoxonasa1

RE- Restricción energética

rhGH- Hormona de crecimiento recombinante humana

RNA- Ácido ribonucleico

ROS- Radicales libres de oxígeno

s- Ratón control salino

TG- Triglicéridos

VHDL- Lipoproteínas de muy alta densidad

VLDL- Lipoproteínas de muy baja densidad

V- Ratones viejos de 18 meses

9 BIBLIOGRAFÍA

Agis-Torres, A., M. E. Lopez-Oliva, M. T. Unzaga y E. Munoz-Martinez (2002). "Body growth and substrate partitioning for fat and protein gain in weaned BALB/c mice treated with growth hormone." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **132**(2): 247-256.

Albert, S. G., M. J. Haas y A. D. Mooradian (2007). "The effects of recombinant human growth hormone (rhGH) supplementation on adipokines and C-reactive protein in obese subjects." *Growth Horm IGF Res* **17**(1): 19-25.

Allard, J. B. y C. Duan (2011). "Comparative endocrinology of aging and longevity regulation." *Front Endocrinol (Lausanne)* **2**: 75.

Allard, S., V. Gosein, A. C. Cuello y A. Ribeiro-da-Silva (2011). "Changes with aging in the dopaminergic and noradrenergic innervation of rat neocortex." *Neurobiol Aging* **32**(12): 2244-2253.

Anderson, R. M., D. Shanmuganayagam y R. Weindruch (2009). "Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys." *Toxicol Pathol* **37**(1): 47-51.

Angelopoulos, T. J., R. L. Seip y T. G. Cole (1998). "Effect of short-term recombinant growth hormone administration on plasma lipoproteins in elderly adults." *Gerontology* **44**(4): 228-231.

AOAC International. (1995). Official methods of analysis of AOAC International. Arlington, Va., AOAC International: v. (loose-leaf).

Arbones, G., A. Carbajal, B. Gonzalvo, M. Gonzalez-Gross, M. Joyanes, I. Marques-Lopes, M. L. Martin, A. Martinez, P. Montero, C. Nunez, I. Puigdueta, J. Quer, M. Rivero, M. A. Roset, F. J. Sanchez-Muniz y M. P. Vaquero (2003). "[Nutrition and dietary recommendations for the elderly "Public Health" Working Group of the Spanish Nutrition Society]." *Nutr Hosp* **18**(3): 109-137.

Ariznavarreta, C., C. Castillo, G. Segovia, F. Mora, I. Azcoitia y J. A. Tresguerres (2003). "Growth hormone and aging." *Homo* **54**(2): 132-141.

Aronow, W. S. (2004). "Lipids and the elderly." *Rev Endocr Metab Disord* **5**(4): 359-364.

Ash, C. E. y B. J. Merry (2011). "The molecular basis by which dietary restricted feeding reduces mitochondrial reactive oxygen species generation." *Mech Ageing Dev* **132**(1-2): 43-54.

Asztalos, B., M. Lefevre, L. Wong, T. A. Foster, R. Tulley, M. Windhauser, W. Zhang y P. S. Roheim (2000). "Differential response to low-fat diet between low and normal HDL-cholesterol subjects." *J Lipid Res* **41**(3): 321-328.

Attallah, H., A. L. Friedlander y A. R. Hoffman (2006). "Visceral obesity, impaired glucose tolerance, metabolic syndrome, and growth hormone therapy." *Growth Horm IGF Res* **16 Suppl A**: S62-67.

Aviram, M. y J. Vaya (2013). "Paraoxonase 1 activities, regulation, and interactions with atherosclerotic lesion." *Curr Opin Lipidol* **24**(4): 339-344.

Azcoitia, I., M. Perez-Martin, V. Salazar, C. Castillo, C. Ariznavarreta, L. M. Garcia-Segura y J. A. Tresguerres (2005). "Growth hormone prevents neuronal loss in the aged rat hippocampus." *Neurobiol Aging* **26**(5): 697-703.

Baeza, I., C. Alvarado, P. Alvarez, V. Salazar, C. Castillo, C. Ariznavarreta, J. A. Fdez-Tresguerres y M. De la Fuente (2009). "Improvement of leucocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens." *J Reprod Immunol* **80**(1-2): 70-79.

Balaban, R. S., S. Nemoto y T. Finkel (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." *Cell* **120**(4): 483-495.

Bansch, D., A. Dirkes-Kersting, H. Schulte, G. Assmann y A. von Eckardstein (1997). "Basal growth hormone levels are positively correlated with high-density lipoprotein cholesterol levels in women." *Metabolism* **46**(9): 1039-1043.

Barja, G. (2004). "Free radicals and aging." *Trends Neurosci* **27**(10): 595-600.

Barja, G., S. Cadenas, C. Rojas, R. Perez-Campo y M. Lopez-Torres (1994). "Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds." *Free Radic Res* **21**(5): 317-327.

Barja, G. y A. Herrero (1998). "Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon." *J Bioenerg Biomembr* **30**(3): 235-243.

Barter, P. J. (2002). "Hugh sinclair lecture: the regulation and remodelling of HDL by plasma factors." *Atheroscler Suppl* **3**(4): 39-47.

Bartke, A. (2002). "Insulin-like growth factor 1 and mammalian aging." *Sci Aging Knowledge Environ* **2002**(16): vp4.

Bartke, A. (2005). "Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging." *Endocrinology* **146**(9): 3718-3723.

Bartke, A. (2008). "Growth hormone and aging: a challenging controversy." *Clin Interv Aging* **3**(4): 659-665.

Bartke, A. (2008). "Insulin and aging." *Cell Cycle* **7**(21): 3338-3343.

Bartke, A. (2011). "Growth hormone, insulin and aging: the benefits of endocrine defects." *Exp Gerontol* **46**(2-3): 108-111.

Bartke, A., V. Chandrashekar, B. Bailey, D. Zaczek y D. Turyn (2002). "Consequences of growth hormone (GH) overexpression and GH resistance." *Neuropeptides* **36**(2-3): 201-208.

Bartke, A., L. Y. Sun y V. Longo (2013). "Somatotrophic signaling: trade-offs between growth, reproductive development, and longevity." *Physiol Rev* **93**(2): 571-598.

Basu, R., E. Breda, A. L. Oberg, C. C. Powell, C. Dalla Man, A. Basu, J. L. Vittone, G. G. Klee, P. Arora, M. D. Jensen, G. Toffolo, C. Cobelli y R. A. Rizza (2003). "Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance." *Diabetes* **52**(7): 1738-1748.

Bates, P. C. y J. M. Pell (1991). "Action and interaction of growth hormone and the beta-agonist, clenbuterol, on growth, body composition and protein turnover in dwarf mice." *Br J Nutr* **65**(2): 115-129.

Baumann, G., M. A. Shaw y K. Amburn (1989). "Regulation of plasma growth hormone-binding proteins in health and disease." *Metabolism* **38**(7): 683-689.

Baumann, G., M. A. Shaw y K. Amburn (1994). "Circulating Growth-Hormone Binding-Proteins." *Journal of Endocrinological Investigation* **17**(1): 67-81.

Beckman, K. B. y B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." *Physiol Rev* **78**(2): 547-581.

Bergmeier, C., R. Siekmeier y W. Gross (2004). "Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions." *Clin Chem* **50**(12): 2309-2315.

Berryman, D. E., J. S. Christiansen, G. Johannsson, M. O. Thorner y J. J. Kopchick (2008). "Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: lessons from animal models." *Growth Horm IGF Res* **18**(6): 455-471.

Bertrand, H. A., F. T. Lynd, E. J. Masoro y B. P. Yu (1980). "Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life-prolonging restricted diet." *J Gerontol* **35**(6): 827-835.

Bielohuby, M., M. Schaab, M. Kummann, M. Sawitzky, R. Gebhardt, G. Binder, J. Frystyk, M. Bjerre, A. Hoeflich, J. Kratzsch y M. Bidlingmaier (2011). "Serum IGF-I is not a reliable pharmacodynamic marker of exogenous growth hormone activity in mice." *Endocrinology* **152**(12): 4764-4776.

Birzniece, V., A. E. Nelson y K. K. Ho (2011). "Growth hormone and physical performance." *Trends Endocrinol Metab* **22**(5): 171-178.

Blair, R. M., S. E. Appt, C. Bennetau-Pelissero, T. B. Clarkson, M. S. Anthony, V. Lamothe y S. M. Potter (2002). "Dietary soy and soy isoflavones have gender-specific effects on plasma lipids and isoflavones in golden Syrian f(1)b hybrid hamsters." *J Nutr* **132**(12): 3585-3591.

Blissett, J., G. Harris y J. Kirk (2000). "Effect of growth hormone therapy on feeding problems and food intake in children with growth disorders." *Acta Paediatr* **89**(6): 644-649.

Blucher, M. (2008). "Fat tissue and long life." *Obes Facts* **1**(4): 176-182.

Boisclair, Y. R., D. E. Bauman, A. W. Bell, F. R. Dunshea y M. Harkins (1994). "Nutrient utilization and protein turnover in the hindlimb of cattle treated with bovine somatotropin." *J Nutr* **124**(5): 664-673.

Bounafaa, A., H. Berrougui, S. Ikhlef, A. Essamadi, B. Nasser, A. Bennis, N. Yamoul, N. Ghalim y A. Khalil (2014). "Alteration of HDL functionality and PON1 activities in acute coronary syndrome patients." *Clin Biochem* **47**(18): 318-325.

Brioche, T., R. A. Kireev, S. Cuesta, A. Gratas-Delamarche, J. A. Tresguerres, M. C. Gomez-Cabrera y J. Vina (2014). "Growth hormone replacement therapy prevents sarcopenia by a dual mechanism: improvement of protein balance and of antioxidant defenses." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **69**(10): 1186-1198.

Brown-Borg, H. M. y S. G. Rakoczy (2003). "Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system." *Mech Ageing Dev* **124**(10-12): 1013-1024.

Brown-Borg, H. M., S. G. Rakoczy, M. A. Romanick y M. A. Kennedy (2002). "Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on hepatocyte antioxidative enzymes." *Exp Biol Med (Maywood)* **227**(2): 94-104.

Bruce, R. y M. D. Troen (2003). "The Biology of aging." *Mount Sinai Journal of Medicine* **70**: 3-22.

Buque, X., P. Aspichueta y B. Ochoa (2008). "Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis." *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas* **100**(9): 565-578.

Camps, J., J. Marsillach y J. Joven (2009). "Pharmacological and lifestyle factors modulating serum paraoxonase-1 activity." *Mini Rev Med Chem* **9**(8): 911-920.

Carrascosa, A., L. Audi, M. Fernandez-Cancio, D. Yeste, M. Gussinye, M. A. Albisu, M. Clemente, A. Fabregas, J. Bel, R. Nosas, M. Rabanal, C. del Pozo, J. M. Gomez, J. Mesa y S. Catalan Group for Short Stature (2011). "Growth hormone secretory status evaluated by growth hormone peak after two pharmacological growth hormone release stimuli did not significantly influence the two-year catch-up growth induced by growth hormone therapy in 318 prepubertal short children with idiopathic growth retardation." *Horm Res Paediatr* **75**(2): 106-114.

Carrillo, A., R. Rising, R. Tverskaya y F. Lifshitz (1998). "Effects of exogenous recombinant human growth hormone on an animal model of suboptimal nutrition." *J Am Coll Nutr* **17**(3): 276-281.

Castillo, C., M. Cruzado, C. Ariznavarreta, P. Gil-Loyzaga, V. Lahera, V. Cachofeiro y J. A. Tresguerres (2003). "Body composition and vascular effects of growth hormone administration in old female rats." *Exp Gerontol* **38**(9): 971-979.

Castillo, C., M. Cruzado, C. Ariznavarreta, P. Gil-Loyzaga, V. Lahera, V. Cachofeiro y J. A. F. Tresguerres (2005). "Effect of recombinant human growth hormone administration on body composition and vascular function and structure in old male Wistar rats." *Biogerontology* **6**(5): 303-312.

Cittadini, A., H. Stromer, S. E. Katz, R. Clark, A. C. Moses, J. P. Morgan y P. S. Douglas (1996). "Differential cardiac effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the rat - A combined in vivo and in vitro evaluation." *Circulation* **93**(4): 800-809.

Clarke, P. G. y S. Clarke (1996). "Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena." *Anat Embryol (Berl)* **193**(2): 81-99.

Colao, A., P. Marzullo, C. Di Somma y G. Lombardi (2001). "Growth hormone and the heart." *Clin Endocrinol (Oxf)* **54**(2): 137-154.

Costa, L. G., T. B. Cole, G. P. Jarvik y C. E. Furlong (2003). "Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism." *Annu Rev Med* **54**: 371-392.

Costa, L. G., G. Giordano y C. E. Furlong (2011). "Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on." *Biochem Pharmacol* **81**(3): 337-344.

Costa, L. G., A. Vitalone, T. B. Cole y C. E. Furlong (2005). "Modulation of paraoxonase (PON1) activity." *Biochem Pharmacol* **69**(4): 541-550.

Costopoulos, C., T. V. Liew y M. Bennett (2008). "Ageing and atherosclerosis: Mechanisms and therapeutic options." *Biochem Pharmacol* **75**(6): 1251-1261.

Couzin-Frankel, J. (2011). "Genetics. Aging genes: the sirtuin story unravels." *Science* **334**(6060): 1194-1198.

Cross, C. E., B. Halliwell, E. T. Borish, W. A. Pryor, B. N. Ames, R. L. Saul, J. M. McCord y D. Harman (1987). "Oxygen radicals and human disease." *Ann Intern Med* **107**(4): 526-545.

Cuttica, C. M., L. Castoldi, G. P. Gorrini, F. Peluffo, G. Delitala, P. Filippa, G. Fanciulli y M. Giusti (1997). "Effects of six-month administration of recombinant human growth hormone to healthy elderly subjects." *Aging (Milano)* **9**(3): 193-197.

Chapman, I. M. (2004). "Endocrinology of anorexia of ageing." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **18**(3): 437-452.

Chen, J. J. y B. P. Yu (1996). "Detoxification of reactive aldehydes in mitochondria: effects of age and dietary restriction." *Aging (Milano)* **8**(5): 334-340.

Cheng, X. y C. D. Klaassen (2012). "Hormonal and chemical regulation of paraoxonases in mice." *J Pharmacol Exp Ther* **342**(3): 688-695.

Chiba, T., H. Yamaza y I. Shimokawa (2007). "Role of insulin and growth hormone/insulin-like growth factor-I signaling in lifespan extension: rodent longevity models for studying aging and calorie restriction." *Curr Genomics* **8**(7): 423-428.

Chikani, V. y K. K. Ho (2014). "Action of GH on skeletal muscle function: molecular and metabolic mechanisms." *J Mol Endocrinol* **52**(1): R107-123.

Cho, A. R., S. W. Rha, S. H. Park, H. G. Lee, S. W. Lee, W. Y. Shin, S. J. Lee, D. K. Jin, A. Elnagar, B. G. Choi, S. I. Im, S. Kim, J. O. Na, S. W. Han, C. U. Choi, H. E. Lim, J. W. Kim, E. J. Kim, H. S. Seo, C. G. Park, y col. (2012). "Serum Adipocyte-Specific Fatty Acid-Binding Protein is a Predictable Marker of Coronary Artery Disease and Diabetes Mellitus." *American Journal of Cardiology* **109**(7): 129s-130s.

Chou, M. W., R. A. Pegram, P. Gao, S. R. Hansard, J. G. Shaddock y D. A. Casciano (1991). "The effects of dietary restriction and aging on in vivo and in vitro binding of aflatoxin B1 to cellular DNA." *Biomed Environ Sci* **4**(1-2): 134-143.

Daughaday, W. H. y B. Trivedi (1991). "Clinical aspects of GH binding proteins." *Acta Endocrinol (Copenh)* **124 Suppl 2**: 27-32.

Daughaday, W. H., B. Trivedi y M. Kapadia (1981). "Measurement of insulin-like growth factor II by a specific radioreceptor assay in serum of normal individuals, patients with abnormal growth hormone secretion, and patients with tumor-associated hypoglycemia." *J Clin Endocrinol Metab* **53**(2): 289-294.

Davidson, M. B., D. C. Shen, N. Venkatesan y G. Sladen (1987). "In vivo insulin antagonism but evanescent in vitro tissue effect in rats with growth hormone-secreting tumors." *J Endocrinol Invest* **10**(6): 569-574.

Deakin, S., X. Moren y R. W. James (2005). "Very low density lipoproteins provide a vector for secretion of paraoxonase-1 from cells." *Atherosclerosis* **179**(1): 17-25.

DeNino, W. F., A. Tchernof, I. J. Dionne, M. J. Toth, P. A. Ades, C. K. Sites y E. T. Poehlman (2001). "Contribution of abdominal adiposity to age-related differences in insulin sensitivity and plasma lipids in healthy nonobese women." *Diabetes Care* **24**(5): 925-932.

Desai, S., S. S. Baker, W. Liu, D. A. Moya, R. W. Browne, L. Mastrandrea, R. D. Baker y L. Zhu (2014). "Paraoxonase 1 and oxidative stress in paediatric non-alcoholic steatohepatitis." *Liver Int* **34**(1): 110-117.

Ding, J., E. O. List, B. D. Bower y J. J. Kopchick (2011). "Differential effects of growth hormone versus insulin-like growth factor-I on the mouse plasma proteome." *Endocrinology* **152**(10): 3791-3802.

DiPietro, L., L. D. Katz y E. R. Nadel (1999). "Excess abdominal adiposity remains correlated with altered lipid concentrations in healthy older women." *Int J Obes Relat Metab Disord* **23**(4): 432-436.

Dirican, M., S. Tas y E. Sarandol (2007). "High-dose taurine supplementation increases serum paraoxonase and arylesterase activities in experimental hypothyroidism." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**(9): 833-837.

Doris, R., R. G. Vernon, M. D. Houslay y E. Kilgour (1994). "Growth hormone decreases the response to anti-lipolytic agonists and decreases the levels of Gi2 in rat adipocytes." *Biochem J* **297** (Pt 1): 41-45.

- Edens, A. y F. Talamantes** (1998). "Alternative processing of growth hormone receptor transcripts." *Endocr Rev* **19**(5): 559-582.
- Eisemann, J. H., A. C. Hammond, T. S. Rumsey y D. E. Bauman** (1989). "Nitrogen and protein metabolism and metabolites in plasma and urine of beef steers treated with somatotropin." *J Anim Sci* **67**(1): 105-115.
- Etherton, T. D.** (2000). "The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning." *J Nutr* **130**(11): 2623-2625.
- Farid, A. S., K. Honkawa, E. M. Fath, N. Nonaka y Y. Horii** (2013). "Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows." *BMC Vet Res* **9**: 73.
- Fasshauer, M. y M. Bluher** (2015). "Adipokines in health and disease." *Trends Pharmacol Sci* **36**(7): 461-470.
- Fernandez-Tresguerres, J. A.** (1998). "[The growth hormone and aging]." *An R Acad Nac Med (Madr)* **115**(4): 907-917; discussion 917-922.
- Ferrannini, E., S. Vichi, H. Beck-Nielsen, M. Laakso, G. Paolisso y U. Smith** (1996). "Insulin action and age. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)." *Diabetes* **45**(7): 947-953.
- Ferre, N., J. Camps, E. Prats, E. Vilella, A. Paul, L. Figuera y J. Joven** (2002). "Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage." *Clin Chem* **48**(2): 261-268.
- Feuers, R. J., R. Weindruch y R. W. Hart** (1993). "Caloric restriction, aging, and antioxidant enzymes." *Mutat Res* **295**(4-6): 191-200.
- Finch, K. E.** (1990). "[Prospects for research on the modulation of gene activity during brain aging]." *Fiziol Zh* **36**(5): 55-62.
- Flyvbjerg, A., K. D. Jorgensen, S. M. Marshall y H. Orskov** (1991). "Inhibitory effect of octreotide on growth hormone-induced IGF-I generation and organ growth in hypophysectomized rats." *Am J Physiol* **260**(4 Pt 1): E568-574.
- Fors, H., H. Matsuoka, I. Bosaeus, S. Rosberg, K. A. Wikland y R. Bjarnason** (1999). "Serum leptin levels correlate with growth hormone secretion and body fat in children." *J Clin Endocrinol Metab* **84**(10): 3586-3590.

Frame, L. T., R. W. Hart y J. E. Leakey (1998). "Caloric restriction as a mechanism mediating resistance to environmental disease." *Environ Health Perspect* **106 Suppl 1**: 313-324.

Freda, P. U., W. Shen, S. B. Heymsfield, C. M. Reyes-Vidal, E. B. Geer, J. N. Bruce y D. Gallagher (2008). "Lower visceral and subcutaneous but higher intermuscular adipose tissue depots in patients with growth hormone and insulin-like growth factor I excess due to acromegaly." *J Clin Endocrinol Metab* **93**(6): 2334-2343.

Fryburg, D. A. y E. J. Barrett (1993). "Growth hormone acutely stimulates skeletal muscle but not whole-body protein synthesis in humans." *Metabolism* **42**(9): 1223-1227.

Fuhrman, B., N. Volkova y M. Aviram (2005). "Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons." *Atherosclerosis* **180**(1): 55-61.

Fusco, D., G. Colloca, M. R. Lo Monaco y M. Cesari (2007). "Effects of antioxidant supplementation on the aging process." *Clin Interv Aging* **2**(3): 377-387.

Gaidukov, L., M. Rosenblat, M. Aviram y D. S. Tawfik (2006). "The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux." *J Lipid Res* **47**(11): 2492-2502.

Gallagher, M., J. L. Bizon, E. C. Hoyt, K. A. Helm y P. K. Lund (2003). "Effects of aging on the hippocampal formation in a naturally occurring animal model of mild cognitive impairment." *Exp Gerontol* **38**(1-2): 71-77.

Garry, P., P. Collins y J. G. Devlin (1996). "An open 36-month study of lipid changes with growth hormone in adults: lipid changes following replacement of growth hormone in adult acquired growth hormone deficiency." *Eur J Endocrinol* **134**(1): 61-66.

Gautsch, T. A., S. M. Kandi, S. M. Donovan y D. K. Layman (1999). "Growth hormone promotes somatic and skeletal muscle growth recovery in rats following chronic protein-energy malnutrition." *J Nutr* **129**(4): 828-837.

Gedik, C. M., G. Grant, P. C. Morrice, S. G. Wood y A. R. Collins (2005). "Effects of age and dietary restriction on oxidative DNA damage, antioxidant protection and DNA repair in rats." *Eur J Nutr* **44**(5): 263-272.

Gems, D. y L. Partridge (2001). "Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture." *Curr Opin Genet Dev* **11**(3): 287-292.

Genuth, S., D. Nathan, H. Shamoon, H. Duffy, S. Engel, H. Engel, W. Dahms, L. Mayer, S. Pendegras, H. Zagarra, D. Miller, L. Singerman, D. Brillion, M. Lackaye, M. Heinemann, F. Rahhal, V. Reppuci, T. Lee, F. Whitehouse, D. Kruger, y col. (2001). "Beneficial effects of

intensive therapy of diabetes during adolescence: Outcomes after the conclusion of the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)." *Journal of Pediatrics* **139**(6): 804-812.

Gibney, J., J. D. Wallace, T. Spinks, L. Schnorr, A. Ranicar, R. C. Cuneo, S. Lockhart, K. G. Burnand, F. Salomon, P. H. Sonksen y D. Russell-Jones (1999). "The effects of 10 years of recombinant human growth hormone (GH) in adult GH-deficient patients." *J Clin Endocrinol Metab* **84**(8): 2596-2602.

Giordano, R., L. Bonelli, E. Marinazzo, E. Ghigo y E. Arvat (2008). "Growth hormone treatment in human ageing: benefits and risks." *Hormones (Athens)* **7**(2): 133-139.

Glazier, D. S. (2005). "Beyond the '3/4-power law': variation in the intra- and interspecific scaling of metabolic rate in animals." *Biol Rev Camb Philos Soc* **80**(4): 611-662.

Graham, M. R., P. Evans, B. Davies y J. S. Baker (2008). "Arterial pulse wave velocity, inflammatory markers, pathological GH and IGF states, cardiovascular and cerebrovascular disease." *Vasc Health Risk Manag* **4**(6): 1361-1371.

Grant, A. L., W. G. Helferich, S. A. Kramer, R. A. Merkel y W. G. Bergen (1991). "Administration of growth hormone to pigs alters the relative amount of insulin-like growth factor-I mRNA in liver and skeletal muscle." *J Endocrinol* **130**(3): 331-338.

Gredilla, R., G. Barja y M. Lopez-Torres (2001). "Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source." *J Bioenerg Biomembr* **33**(4): 279-287.

Grottoli, S., C. Gauna, F. Tassone, G. Aimaretti, G. Corneli, Z. Wu, C. J. Strasburger, C. Dieguez, F. F. Casanueva, E. Ghigo y M. Maccario (2003). "Both fasting-induced leptin reduction and GH increase are blunted in Cushing's syndrome and in simple obesity." *Clin Endocrinol (Oxf)* **58**(2): 220-228.

Guarner, V. y M. E. Rubio-Ruiz (2012). "Aging, Metabolic Syndrome and the Heart." *Aging and Disease* **3**(3): 269-279.

Gugliucci, A. y T. Menini (2015). "Paraoxonase 1 and HDL maturation." *Clin Chim Acta* **439**: 5-13.

Guler, H. P., J. Zapf y E. R. Froesch (1987). "Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I in healthy adults." *N Engl J Med* **317**(3): 137-140.

Guler, H. P., J. Zapf, E. Scheiwiller y E. R. Froesch (1988). "Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(13): 4889-4893.

Gutteridge, J. M. y B. Halliwell (1990). "The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems." *Trends Biochem Sci* **15**(4): 129-135.

Hadley, A. J., J. C. Buckingham y M. D. Kendall (1992). "Selective Effects of Thymic Peptides on the Release of Pituitary-Hormones by Rat Adenohypophyseal Tissue Invitro." *British Journal of Pharmacology* **107**: P230-P230.

Hakansson, A., B. Zhivotovsky, S. Orrenius, H. Sabharwal y C. Svanborg (1995). "Apoptosis induced by a human milk protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 8064-8068.

Hall, K., G. Enberg, M. Ritzen, H. Svan, L. Fryklund y K. Takano (1980). "Somatomedin A levels in serum from healthy children and from children with growth hormone deficiency or delayed puberty." *Acta Endocrinol (Copenh)* **94**(2): 155-165.

Harel, Z. y G. S. Tannenbaum (1995). "Long-term alterations in growth hormone and insulin secretion after temporary dietary protein restriction in early life in the rat." *Pediatr Res* **38**(5): 747-753.

Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol* **11**(3): 298-300.

Harman, D. (1992). "Free radical theory of aging: history." *EXS* **62**: 1-10.

Hassett, C., R. J. Richter, R. Humbert, C. Chapline, J. W. Crabb, C. J. Omiecinski y C. E. Furlong (1991). "Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence." *Biochemistry* **30**(42): 10141-10149.

Hayashi, M., M. Shimohira, S. Saisho, K. Shimozaawa y Y. Iwakawa (1992). "Sleep disturbance in children with growth hormone deficiency." *Brain Dev* **14**(3): 170-174.

Heredia, M., A. Fuente, J. Criado, J. Yajeya, J. Devesa y A. S. Riobos (2013). "Early growth hormone (GH) treatment promotes relevant motor functional improvement after severe frontal cortex lesion in adult rats." *Behav Brain Res* **247**: 48-58.

Higa, T. S., F. C. Bergamo, F. Mazzucatto, M. H. Fonseca-Alaniz y F. S. Evangelista (2012). "Physical training prevents body weight gain but does not modify adipose tissue gene expression." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **45**(10): 988-994.

Ho, K. Y., J. D. Veldhuis, M. L. Johnson, R. Furlanetto, W. S. Evans, K. G. Alberti y M. O. Thorner (1988). "Fasting enhances growth hormone secretion and amplifies the complex rhythms of growth hormone secretion in man." *J Clin Invest* **81**(4): 968-975.

Hocquette, J. F., M. C. Postel-Vinay, J. Djiane, A. Tar y P. A. Kelly (1990). "Human liver growth hormone receptor and plasma binding protein: characterization and partial purification." *Endocrinology* **127**(4): 1665-1672.

Hoffman, A. R., J. E. Kuntze, J. Baptista, H. B. Baum, G. P. Baumann, B. M. Biller, R. V. Clark, D. Cook, S. E. Inzucchi, D. Kleinberg, A. Klibanski, L. S. Phillips, E. C. Ridgway, R. J. Robbins, J. Schlechte, M. Sharma, M. O. Thorner y M. L. Vance (2004). "Growth hormone (GH) replacement therapy in adult-onset gh deficiency: effects on body composition in men and women in a double-blind, randomized, placebo-controlled trial." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(5): 2048-2056.

Holgado, M., M. Deluis y J. F. Macias (1994). "Características de los radicales libres." *Rev Esp Geriatr Gerontol* **29**(3): 155-167.

Holloway, L., G. Butterfield, R. L. Hintz, N. Gesundheit y R. Marcus (1994). "Effects of recombinant human growth hormone on metabolic indices, body composition, and bone turnover in healthy elderly women." *J Clin Endocrinol Metab* **79**(2): 470-479.

Huang, C. J. y M. L. Fwu (1992). "Protein insufficiency aggravates the enhanced lipid peroxidation and reduced activities of antioxidative enzymes in rats fed diets high in polyunsaturated fat." *J Nutr* **122**(5): 1182-1189.

Hughes, J. P. y H. G. Friesen (1985). "The nature and regulation of the receptors for pituitary growth hormone." *Annu Rev Physiol* **47**: 469-482.

Hulbert, A. J., R. Pamplona, R. Buffenstein y W. A. Buttemer (2007). "Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals." *Physiol Rev* **87**(4): 1175-1213.

Imaki, T., T. Shibasaki, A. Masuda, M. Hotta, N. Yamauchi, H. Demura, K. Shizume, I. Wakabayashi y N. Ling (1986). "The effect of glucose and free fatty acids on growth hormone (GH)-releasing factor-mediated GH secretion in rats." *Endocrinology* **118**(6): 2390-2394.

Ingram, D. K., R. Weindruch, E. L. Spangler, J. R. Freeman y R. L. Walford (1987). "Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice." *J Gerontol* **42**(1): 78-81.

Inoue, M., E. F. Sato, M. Nishikawa, A. M. Park, Y. Kira, I. Imada y K. Utsumi (2003). "Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life." *Curr Med Chem* **10**(23): 2495-2505.

Isaksson, O. G., J. O. Jansson y I. A. Gause (1982). "Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly." *Science* **216**(4551): 1237-1239.

Jacquot, A., S. F. Gauthier, R. Drouin y Y. Boutin (2010). "Proliferative effects of synthetic peptides from beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin on murine splenocytes." *International Dairy Journal* **20**(8): 514-521.

Jazwinski, S. M. (2000). "Metabolic control and ageing." *Trends Genet* **16**(11): 506-511.

Jeay, S., G. E. Sonenshein, M. C. Postel-Vinay y E. Baixeras (2000). "Growth hormone prevents apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in interleukin-3-dependent Ba/F3 cell line." *Mol Endocrinol* **14**(5): 650-661.

Johansen, T., B. Richelsen, H. S. Hansen, N. Din y K. Malmlof (2003). "Growth hormone-mediated breakdown of body fat: effects of GH on lipases in adipose tissue and skeletal muscle of old rats fed different diets." *Horm Metab Res* **35**(4): 243-250.

Jorgensen, J. O., W. F. Blum, N. Moller, M. B. Ranke y J. S. Christiansen (1991). "Short-term changes in serum insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding protein 3 after different modes of intravenous growth hormone (GH) exposure in GH-deficient patients." *J Clin Endocrinol Metab* **72**(3): 582-587.

Jorgensen, J. O., L. Moller, M. Krag, N. Billestrup y J. S. Christiansen (2007). "Effects of growth hormone on glucose and fat metabolism in human subjects." *Endocrinol Metab Clin North Am* **36**(1): 75-87.

Juul, A., P. Dalgaard, W. F. Blum, P. Bang, K. Hall, K. F. Michaelsen, J. Muller y N. E. Skakkebaek (1995). "Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children, and adolescents: the relation to IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and pubertal maturation." *J Clin Endocrinol Metab* **80**(8): 2534-2542.

Kale, S. P. y S. M. Jazwinski (1996). "Differential response to UV stress and DNA damage during the yeast replicative life span." *Dev Genet* **18**(2): 154-160.

Kalhan, S. C., S. O. Uppal, J. L. Moorman, C. Bennett, L. L. Gruca, P. S. Parimi, S. Dasarathy, D. Serre y R. W. Hanson (2011). "Metabolic and genomic response to dietary isocaloric protein restriction in the rat." *J Biol Chem* **286**(7): 5266-5277.

Kanis, E., G. J. Nieuwhof, K. H. de Greef, W. van der Hel, M. W. Verstegen, J. Huisman y P. van der Wal (1990). "Effect of recombinant porcine somatotropin on growth and carcass quality in growing pigs: interactions with genotype, gender and slaughter weight." *J Anim Sci* **68**(5): 1193-1200.

- Karbownik-Lewinska, M., A. Kokoszko, K. C. Lewandowski, S. M. Shalet y A. Lewinski** (2008). "GH replacement reduces increased lipid peroxidation in GH-deficient adults." *Clin Endocrinol (Oxf)* **68**(6): 957-964.
- Kasukawa, Y., D. J. Baylink, R. Q. Guo y S. Mohan** (2003). "Evidence that sensitivity to growth hormone (GH) is growth period and tissue type dependent: Studies in GH-deficient lit/lit mice." *Endocrinology* **144**(9): 3950-3957.
- Kee, H. J.** (1998). "Effect of enzymatically hydrolyzed with pepsin on growth promoting of Bifidobacterium Longun." *Korean Journal of Dairy Science* **20** (1): 61-68.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie y A. R. Currie** (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.
- Keskin, M., E. Dolar, M. Dirican, M. Kiyici, Y. Yilmaz, S. Gurel, S. G. Nak, S. Erdinc y M. Gulden** (2009). "Baseline and salt-stimulated paraoxonase and arylesterase activities in patients with chronic liver disease: relation to disease severity." *Intern Med J* **39**(4): 243-248.
- Kim, H., E. Barton, N. Muja, S. Yakar, P. Pennisi y D. Leroith** (2005). "Intact insulin and insulin-like growth factor-I receptor signaling is required for growth hormone effects on skeletal muscle growth and function in vivo." *Endocrinology* **146**(4): 1772-1779.
- Kim, K. R., S. Y. Nam, Y. D. Song, S. K. Lim, H. C. Lee y K. B. Huh** (1999). "Low-dose growth hormone treatment with diet restriction accelerates body fat loss, exerts anabolic effect and improves growth hormone secretory dysfunction in obese adults." *Horm Res* **51**(2): 78-84.
- Kirkwood, T. B.** (2005). "Understanding the odd science of aging." *Cell* **120**(4): 437-447.
- Kiya, T., T. Endo, H. Henmi, T. Goto, Y. Kitajima, K. Manase, S. Takahashi y R. Kudo** (1999). "The effects of growth hormone on corpus luteum of superovulated rats." *Endocr Res* **25**(2): 179-193.
- Knobil, E. y R. O. Greep** (1959). "The Physiology of Growth Hormone with Particular Reference to Its Action in the Rhesus Monkey and the Species Specificity Problem." *Recent Progress in Hormone Research* **15**: 1-69.
- Knyazeva, E. L., V. M. Grishchenko, R. S. Fadeev, V. S. Akatov, S. E. Permyakov y E. A. Permyakov** (2008). "Who is Mr. HAMLET? Interaction of human alpha-lactalbumin with monomeric oleic acid." *Biochemistry* **47**(49): 13127-13137.
- Kopchick, J. J. y J. M. Andry** (2000). "Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction." *Mol Genet Metab* **71**(1-2): 293-314.

Kritchevsky, D. (1975). "The effects of feeding various carbohydrates on the development of hypercholesterolemia and atherosclerosis." *Adv Exp Med Biol* **60**: 231-249.

Kritchevsky, D., L. M. Davidson, H. K. Kim, D. A. Krendel, S. Malhotra, D. Mendelsohn, J. J. van der Watt, J. P. duPlessis y P. A. Winter (1980). "Influence of type of carbohydrate on atherosclerosis in baboons fed semipurified diets plus 0.1% cholesterol." *Am J Clin Nutr* **33**(8): 1869-1887.

Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschoop, J. Yuan, M. Piacentini, y col. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death Differ* **16**(1): 3-11.

Kudin, A. P., N. Y. Bimpong-Buta, S. Vielhaber, C. E. Elger y W. S. Kunz (2004). "Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria." *J Biol Chem* **279**(6): 4127-4135.

Kunes, J. P., K. S. Cordero-Koning, L. H. Lee y S. M. Lynch (2009). "Vitamin C attenuates hypochlorite-mediated loss of paraoxonase-1 activity from human plasma." *Nutr Res* **29**(2): 114-122.

Kushwaha, R. S. y H. C. McGill, Jr. (1998). "Diet, plasma lipoproteins and experimental atherosclerosis in baboons (*Papio sp.*)." *Hum Reprod Update* **4**(4): 420-429.

Laganier, S. y B. P. Yu (1993). "Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction." *Gerontology* **39**(1): 7-18.

Lanes, R., M. Paoli, E. Carrillo, O. Villaroel y A. Palacios (2003). "Cardiovascular risk of young growth-hormone-deficient adolescents. Differences in growth-hormone-treated and untreated patients." *Horm Res* **60**(6): 291-296.

Lanes, R., A. Soros, K. Flores, P. Gunczler, E. Carrillo y J. Bandel (2005). "Endothelial function, carotid artery intima-media thickness, epicardial adipose tissue, and left ventricular mass and function in growth hormone-deficient adolescents: apparent effects of growth hormone treatment on these parameters." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(7): 3978-3982.

Langley, S. C. y A. A. Jackson (1994). "Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets." *Clin Sci (Lond)* **86**(2): 217-222; discussion 121.

Laursen, T. (2004). "Clinical pharmacological aspects of growth hormone administration." *Growth Horm IGF Res* **14**(1): 16-44.

Lee, C. K., R. G. Klopp, R. Weindruch y T. A. Prolla (1999). "Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction." *Science* **285**(5432): 1390-1393.

Leung, D. W., S. A. Spencer, G. Cachianes, R. G. Hammonds, C. Collins, W. J. Henzel, R. Barnard, M. J. Waters y W. I. Wood (1987). "Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression." *Nature* **330**(6148): 537-543.

Leung, K. C. y K. K. Ho (2001). "Measurement of growth hormone, insulin-like growth factor I and their binding proteins: the clinical aspects." *Clin Chim Acta* **313**(1-2): 119-123.

Lien, E. L. (2003). "Infant formulas with increased concentrations of alpha-lactalbumin." *Am J Clin Nutr* **77**(6): 1555S-1558S.

Lima, L., V. Arce, M. J. Díaz, J. A. Tresguerres y J. Devesa (1993). "Glucocorticoids may inhibit growth hormone release by enhancing beta-adrenergic responsiveness in hypothalamic somatostatin neurons." *J Clin Endocrinol Metab* **76**(2): 439-444.

Lissett, C. A., P. E. Clayton y S. M. Shalet (2001). "The acute leptin response to GH." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(9): 4412-4415.

List, E. O., A. J. Palmer, D. E. Berryman, B. Bower, B. Kelder y J. J. Kopchick (2009). "Growth hormone improves body composition, fasting blood glucose, glucose tolerance and liver triacylglycerol in a mouse model of diet-induced obesity and type 2 diabetes." *Diabetologia* **52**(8): 1647-1655.

Liu, J. L. y D. LeRoith (1999). "Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone." *Endocrinology* **140**(11): 5178-5184.

Liu, S. (2002). "Intake of refined carbohydrates and whole grain foods in relation to risk of type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease." *J Am Coll Nutr* **21**(4): 298-306.

Lombardi, G., A. Colao, P. Marzullo, D. Ferone, S. Longobardi, V. Esposito y B. Merola (1997). "Is growth hormone bad for your heart? Cardiovascular impact of GH deficiency and of acromegaly." *J Endocrinol* **155 Suppl 1**: S33-37; discussion S39.

Longo, V. D., A. Antebi, A. Bartke, N. Barzilai, H. M. Brown-Borg, C. Caruso, T. J. Curiel, R. de Cabo, C. Franceschi, D. Gems, D. K. Ingram, T. E. Johnson, B. K. Kennedy, C. Kenyon, S. Klein, J. J. Kopchick, G. Lepperdinger, F. Madeo, M. G. Mirisola, J. R. Mitchell, y col. (2015). "Interventions to Slow Aging in Humans: Are We Ready?" *Aging Cell* **14**(4): 497-510.

Lopez-Lluch, G., P. M. Irusta, P. Navas y R. de Cabo (2008). "Mitochondrial biogenesis and healthy aging." *Exp Gerontol* **43**(9): 813-819.

Lopez-Oliva, E., M. Nus, A. Agis-Torres, W. Villaro, J. M. Sanchez-Montero, E. Munoz-Martinez y F. J. Sanchez-Muniz (2009). "Growth hormone improves lipoprotein concentration and arylesterase activity in mice with an atherogenic lipid profile induced by lactalbumin." *Br J Nutr* **101**(4): 518-526.

Lopez-Oliva, M. E., A. Agis-Torres, M. T. Unzaga y E. Munoz-Martinez (2000). "Feed intake and protein skeletal muscle in growing mice treated with growth hormone: time course effects." *J Physiol Biochem* **56**(1): 9-16.

Lovegrove, B. G. (2010). "The allometry of rodent intestines." *J Comp Physiol B* **180**(5): 741-755.

Luque, R. M., M. D. Gahete, R. J. Valentine y R. D. Kineman (2006). "Examination of the direct effects of metabolic factors on somatotrope function in a non-human primate model, *Papio anubis*." *J Mol Endocrinol* **37**(1): 25-38.

Mackness, B., P. N. Durrington, A. J. Boulton, D. Hine y M. I. Mackness (2002). "Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls." *Eur J Clin Invest* **32**(4): 259-264.

Mackness, M. y B. Mackness (2004). "Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important?" *Free Radic Biol Med* **37**(9): 1317-1323.

Machlin, L. J. (1972). "Effect of porcine growth hormone on growth and carcass composition of the pig." *J Anim Sci* **35**(4): 794-800.

Maeda, H., C. A. Gleiser, E. J. Masoro, I. Murata, C. A. McMahan y B. P. Yu (1985). "Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: II. Pathology." *J Gerontol* **40**(6): 671-688.

Major, J. M., G. A. Laughlin, D. Kritz-Silverstein, D. L. Wingard y E. Barrett-Connor (2010). "Insulin-like growth factor-I and cancer mortality in older men." *J Clin Endocrinol Metab* **95**(3): 1054-1059.

Maki, K. C. y A. K. Phillips (2015). "Dietary substitutions for refined carbohydrate that show promise for reducing risk of type 2 diabetes in men and women." *J Nutr* **145**(1): 159S-163S.

Maki, R. G. (2010). "Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer." *J Clin Oncol* **28**(33): 4985-4995.

Malmlof, K., N. Din, T. Johansen y S. B. Pedersen (2002). "Growth hormone affects both adiposity and voluntary food intake in old and obese female rats." *Eur J Endocrinol* **146**(1): 121-128.

Malmlof, K. y T. Johansen (2003). "Growth hormone-mediated breakdown of body fat: insulin and leptin responses to GH are modulated by diet composition and caloric intake in old rats." *Horm Metab Res* **35**(4): 236-242.

Marcus, C., V. Margery, A. Kamel y M. Bronnegard (1994). "Effects of growth hormone on lipolysis in humans." *Acta Paediatr Suppl* **406**: 54-58; discussion 59.

Markus, C. R., B. Olivier, G. E. Panhuysen, J. Van Der Gugten, M. S. Alles, A. Tuiten, H. G. Westenberg, D. Fekkes, H. F. Koppeschaar y E. E. de Haan (2000). "The bovine protein alpha-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress." *Am J Clin Nutr* **71**(6): 1536-1544.

Martin, B., M. P. Mattson y S. Maudsley (2006). "Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging." *Ageing Res Rev* **5**(3): 332-353.

Masternak, M. M. y A. Bartke (2012). "Growth hormone, inflammation and aging." *Pathobiol Aging Age Relat Dis* **2**.

Masternak, M. M., J. A. Panici, F. Wang, Z. Wang y A. Spong (2010). "The effects of growth hormone (GH) treatment on GH and insulin/IGF-1 signaling in long-lived Ames dwarf mice." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**(1): 24-30.

Matsumoto, R., H. Fukuoka, G. Iguchi, H. Nishizawa, H. Bando, K. Suda, M. Takahashi y Y. Takahashi (2014). "Long-term effects of growth hormone replacement therapy on liver function in adult patients with growth hormone deficiency." *Growth Horm IGF Res* **24**(5): 174-179.

Matsuoka, H., H. Fors, I. Bosaeus, S. Rosberg, K. Albertsson-Wikland y R. Bjarnason (1999). "Changes in body composition and leptin levels during growth hormone (GH) treatment in short children with various GH secretory capacities." *Eur J Endocrinol* **140**(1): 35-42.

Mattison, J. A., G. S. Roth, M. A. Lane y D. K. Ingram (2007). "Dietary restriction in aging nonhuman primates." *Interdiscip Top Gerontol* **35**: 137-158.

McCay, C. M., M. F. Crowell y L. A. Maynard (1935). "The effect of retarded growth upon the length of life-span and upon the ultimate body size." *J. Nutr.* **10**: 63-79.

McLaren, D. G., P. J. Bechtel, G. L. Grebner, J. Novakofski, F. K. McKeith, R. W. Jones, R. H. Dalrymple y R. A. Easter (1990). "Dose response in growth of pigs injected daily with porcine somatotropin from 57 to 103 kilograms." *J Anim Sci* **68**(3): 640-651.

Medveded, Z. (1990). "An attempt at a rational clasification of theories of aging." *Biol Rev* **65**: 375-398.

Meinhardt, U. J. y K. K. Y. Ho (2007). "Regulation of growth hormone action by gonadal steroids." *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **36**(1): 57-+.

Mercer, L. P., D. F. Watson y J. S. Ramlet (1981). "Control of food intake in the rat by dietary protein concentration." *J Nutr* **111**(6): 1117-1123.

Mercken, E. M., B. A. Carboneau, S. M. Krzysik-Walker y R. de Cabo (2012). "Of mice and men: the benefits of caloric restriction, exercise, and mimetics." *Ageing Res Rev* **11**(3): 390-398.

Miller, R. A., D. E. Harrison, C. M. Astle, E. Fernandez, K. Flurkey, M. Han, M. A. Javors, X. Li, N. L. Nadon, J. F. Nelson, S. Pletcher, A. B. Salmon, Z. D. Sharp, S. Van Roekel, L. Winkleman y R. Strong (2014). "Rapamycin-mediated lifespan increase in mice is dose and sex dependent and metabolically distinct from dietary restriction." *Aging Cell* **13**(3): 468-477.

Miquel, J., A. C. Economos, J. Fleming y J. E. Johnson, Jr. (1980). "Mitochondrial role in cell aging." *Exp Gerontol* **15**(6): 575-591.

Mirzaei, H., J. A. Suarez y V. D. Longo (2014). "Protein and amino acid restriction, aging and disease: from yeast to humans." *Trends Endocrinol Metab* **25**(11): 558-566.

Missios, P., Y. Zhou, L. M. Guachalla, G. von Figura, A. Wegner, S. R. Chakkarappan, T. Binz, A. Gompf, G. Hartleben, M. D. Burkhalter, V. Wulff, C. Gunes, R. W. Sattler, Z. Song, T. Illig, S. Klaus, B. O. Bohm, T. Wenz, K. Hiller y K. L. Rudolph (2014). "Glucose substitution prolongs maintenance of energy homeostasis and lifespan of telomere dysfunctional mice." *Nat Commun* **5**: 4924.

Mobbs, C. V., G. A. Bray, R. L. Atkinson, A. Bartke, C. E. Finch, E. Maratos-Flier, J. N. Crawley y J. F. Nelson (2001). "Neuroendocrine and pharmacological manipulations to assess how caloric restriction increases life span." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56 Spec No 1**: 34-44.

Moller, N. y J. O. Jorgensen (2009). "Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects." *Endocr Rev* **30**(2): 152-177.

Moller, N., M. H. Vendelbo, U. Kampmann, B. Christensen, M. Madsen, H. Norrelund y J. O. Jorgensen (2009). "Growth hormone and protein metabolism." *Clin Nutr* **28**(6): 597-603.

Morley, J. E. (1997). "Anorexia of aging: physiologic and pathologic." *Am J Clin Nutr* **66**(4): 760-773.

Motulsky, H. J. (2014). *Intuitive Biostatistics*. Nueva York, Oxford University Press.

Muller, F. L., Y. Liu y H. Van Remmen (2004). "Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane." *J Biol Chem* **279**(47): 49064-49073.

Munzer, T., S. M. Harman, P. Hees, E. Shapiro, C. Christmas, M. F. Bellantoni, T. E. Stevens, K. G. O'Connor, K. M. Pabst, C. St Clair, J. D. Sorkin y M. R. Blackman (2001). "Effects of GH and/or sex steroid administration on abdominal subcutaneous and visceral fat in healthy aged women and men." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(8): 3604-3610.

Murray, R. D., J. E. Adams y S. M. Shalet (2004). "Adults with partial growth hormone deficiency have an adverse body composition." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(4): 1586-1591.

Murray, R. D., K. Kim, S. G. Ren, M. Chelly, Y. Umehara y S. Melmed (2004). "Central and peripheral actions of somatostatin on the growth hormone-IGF-I axis." *J Clin Invest* **114**(3): 349-356.

Nakamoto, N., S. Tada, K. Kameyama, K. Kitamura, S. Kurita, Y. Saito, H. Saito y H. Ishii (2003). "A free radical scavenger, edaravone, attenuates steatosis and cell death via reducing inflammatory cytokine production in rat acute liver injury." *Free Radical Research* **37**(8): 849-859.

Navab, M., S. Y. Hama, G. P. Hough, G. Subbanagounder, S. T. Reddy y A. M. Fogelman (2001). "A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids." *J Lipid Res* **42**(8): 1308-1317.

Navarro, A. y A. Boveris (2007). "The mitochondrial energy transduction system and the aging process." *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(2): C670-686.

Ng, C. J., D. M. Shih, S. Y. Hama, N. Villa, M. Navab y S. T. Reddy (2005). "The paraoxonase gene family and atherosclerosis." *Free Radic Biol Med* **38**(2): 153-163.

Ng, D. S., T. Chu, B. Esposito, P. Hui, P. W. Connelly y P. L. Gross (2008). "Paraoxonase-1 deficiency in mice predisposes to vascular inflammation, oxidative stress, and thrombogenicity in the absence of hyperlipidemia." *Cardiovasc Pathol* **17**(4): 226-232.

Nguyen, S. D. y D. E. Sok (2003). "Beneficial effect of oleoylated lipids on paraoxonase 1: protection against oxidative inactivation and stabilization." *Biochem J* **375**(Pt 2): 275-285.

Ni, W., Y. Tsuda, S. Takashima, H. Sato, M. Sato y K. Imaizumi (2003). "Anti-atherogenic effect of soya and rice-protein isolate, compared with casein, in apolipoprotein E-deficient mice." *Br J Nutr* **90**(1): 13-20.

Nus, M., F. J. Sanchez-Muniz, J. V. S. Gago, E. Lopez-Oliva y M. Sanchez-Montero (2008). "Determination of rat and mice arylesterase activity using serum mimetics." *Enzyme and Microbial Technology* **43**(3): 252-256.

Nus, M., F. J. Sanchez-Muniz y J. M. Sanchez-Montero (2006). "A new method for the determination of arylesterase activity in human serum using simulated body fluid." *Atherosclerosis* **188**(1): 155-159.

Ohlsson, C., B. A. Bengtsson, O. G. Isaksson, T. T. Andreassen y M. C. Sootweg (1998). "Growth hormone and bone." *Endocr Rev* **19**(1): 55-79.

Oliveira, C. R., R. Salvatori, J. A. Barreto-Filho, I. E. Rocha, A. Mari, R. M. Pereira, V. C. Campos, M. Menezes, E. Gomes, R. A. Meneguz-Moreno, V. P. Araujo, N. T. Leite, A. C. Nascimento-Junior, M. I. Farias, T. A. Viscente, R. D. Araujo, E. V. Melo y M. H. Aguiar-Oliveira (2012). "Insulin sensitivity and beta-cell function in adults with lifetime, untreated isolated growth hormone deficiency." *J Clin Endocrinol Metab* **97**(3): 1013-1019.

Orlandi, A., M. L. Bochaton-Piallat, G. Gabbiani y L. G. Spagnoli (2006). "Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: implications for atherosclerosis." *Atherosclerosis* **188**(2): 221-230.

Otte, J., S. M. Shalaby, M. Zakora, A. H. Pripp y S. A. El-Shabrawy (2007). "Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis." *International Dairy Journal* **17**(5): 488-503.

Paigen, B., P. A. Holmes, D. Mitchell y D. Albee (1987). "Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H." *Atherosclerosis* **64**(2-3): 215-221.

Palmer, A. J., M. Y. Chung, E. O. List, J. Walker, S. Okada, J. J. Kopchick y D. E. Berryman (2009). "Age-related changes in body composition of bovine growth hormone transgenic mice." *Endocrinology* **150**(3): 1353-1360.

Pallavi, R., M. Giorgio y P. G. Pelicci (2012). "Insights into the beneficial effect of caloric/dietary restriction for a healthy and prolonged life." *Front Physiol* **3**: 318.

Pamplona, R. y G. Barja (2006). "Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection." *Biochim Biophys Acta* **1757**(5-6): 496-508.

Pamplona, R. y G. Barja (2007). "Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity." *Ageing Res Rev* **6**(3): 189-210.

Pamplona, R., M. Portero-Otin, J. R. Requena, S. R. Thorpe, A. Herrero y G. Barja (1999). "A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat." *Mech Ageing Dev* **106**(3): 283-296.

Paragh, G., P. Balla, E. Katona, I. Seres, A. Egerhazi y I. Degrell (2002). "Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **252**(2): 63-67.

Paredes, S. D., K. A. Forman, C. Garcia, E. Vara, G. Escames y J. A. Tresguerres (2014). "Protective actions of melatonin and growth hormone on the aged cardiovascular system." *Horm Mol Biol Clin Investig* **18**(2): 79-88.

Parini, P., B. Angelin y M. Rudling (1999). "Cholesterol and lipoprotein metabolism in aging: reversal of hypercholesterolemia by growth hormone treatment in old rats." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(4): 832-839.

Parks, J. R. (1982). *A Theory of Feeding and Growth of Animals*. New York, Springer-Verlag.

Paya, C. (2001). "The influence of the growth hormone in the profile of blood pressure. Results in adult patients with a deficiency in this hormone." *Rev Esp Cardiol* **54**: 469-475.

Pellizzon, M. A. (2008). Diet-Induced Atherosclerosis/Hypercholesterolemia in Rodent Models. *Atherosclerosis*, Research Diets Inc.: 1-3.

Perrot, A., M. B. Ranke, R. Dietz y K. J. Osterziel (2001). "Growth hormone treatment in dilated cardiomyopathy." *Journal of Cardiac Surgery* **16**(2): 127-131.

Petrik, J., B. Reusens, E. Arany, C. Remacle, C. Coelho, J. J. Hoet y D. J. Hill (1999). "A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II." *Endocrinology* **140**(10): 4861-4873.

Philipps, A. F., B. Persson, K. Hall, M. Lake, A. Skottner, T. Sanengen y V. R. Sara (1988). "The effects of biosynthetic insulin-like growth factor-1 supplementation on somatic growth, maturation, and erythropoiesis on the neonatal rat." *Pediatr Res* **23**(3): 298-305.

Picardi, A., D. D'Avola, U. V. Gentilucci, G. Galati, E. Fiori, S. Spataro y A. Afeltra (2006). "Diabetes in chronic liver disease: from old concepts to new evidence." *Diabetes Metab Res Rev* **22**(4): 274-283.

Pihlanto-Leppala, A., P. Marnila, L. Hubert, T. Rokka, H. J. T. Korhonen y M. Karp (1999). "The effect of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103." *Journal of Applied Microbiology* **87**(4): 540-545.

Pryor-Jones, R. A. y J. S. Jenkins (1980). "Effect of excessive secretion of growth hormone on tissues of the rat, with particular reference to the heart and skeletal muscle." *J Endocrinol* **85**(1): 75-82.

Puche, J. E. y I. Castilla-Cortazar (2012). "Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency." *J Transl Med* **10**: 224.

Pugh, T. D., T. D. Oberley y R. Weindruch (1999). "Dietary intervention at middle age: Caloric restriction but not dehydroepiandrosterone sulfate increases lifespan and lifetime cancer incidence in mice." *Cancer Research* **59**(7): 1642-1648.

Qiu, S., J. D. Mintz, C. D. Salet, W. Han, A. Giannis, F. Chen, Y. Yu, Y. Su, D. J. Fulton y D. W. Stepp (2014). "Increasing Muscle Mass Improves Vascular Function in Obese (db/db) Mice." *Journal of the American Heart Association* **3**(3): e000854-e000854.

Quemeneur, T., F. Martin-Nizard, A. Kandoussi, X. Kyndt, P. Vanhille, E. Hachulla, P. Y. Hatron, J. C. Fruchart, P. Duriez y M. Lambert (2007). "PON1, a new biomarker of cardiovascular disease, is low in patients with systemic vasculitis." *Semin Arthritis Rheum* **37**(3): 149-155.

Raben, M. S. (1957). "Preparation of growth hormone from pituitaries of man and monkey." *Science* **125**(3253): 883-884.

Raben, M. S. (1958). "Treatment of a Pituitary Dwarf with Human Growth Hormone." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **18**(8): 901-903.

Rasmussen, M. H. (2010). "Obesity, growth hormone and weight loss." *Mol Cell Endocrinol* **316**(2): 147-153.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen y G. C. Fahey, Jr. (1993). "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." *J Nutr* **123**(11): 1939-1951.

Riley, P. A. (1994). "Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation." *Int J Radiat Biol* **65**(1): 27-33.

Rivadeneira, D. E., S. R. Grobmyer, H. A. Naama, P. J. Mackrell, J. R. Mestre, P. P. Stapleton y J. M. Daly (2001). "Malnutrition-induced macrophage apoptosis." *Surgery* **129**(5): 617-625.

- Roberts, T. J., M. J. Azain, B. D. White y R. J. Martin** (1995). "Rats treated with somatotropin select diets higher in protein." *J Nutr* **125**(10): 2669-2678.
- Rose, M. R.** (1999). "Can human aging be postponed?" *Sci Am* **281**(6): 106-111.
- Rosen, A.** (1997). *Growth Hormone in adults: physiological and clinical aspects*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Rosenblat, M., A. Elias, N. Volkova y M. Aviram** (2013). "Monocyte-macrophage membrane possesses free radicals scavenging activity: stimulation by polyphenols or by paraoxonase 1 (PON1)." *Free Radic Res* **47**(4): 257-267.
- Rosenblat, M., J. Vaya, D. Shih y M. Aviram** (2005). "Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine." *Atherosclerosis* **179**(1): 69-77.
- Ross, D.** (1989). "Mechanistic toxicology: a radical perspective." *J Pharm Pharmacol* **41**(8): 505-511.
- Rozenberg, O., D. M. Shih y M. Aviram** (2003). "Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(3): 461-467.
- Rudman, D., A. G. Feller, H. S. Nagraj, G. A. Gergans, P. Y. Lalitha, A. F. Goldberg, R. A. Schlenker, L. Cohn, I. W. Rudman y D. E. Mattson** (1990). "Effects of human growth hormone in men over 60 years old." *N Engl J Med* **323**(1): 1-6.
- Sacca, L., A. Cittadini y S. Fazio** (1994). "Growth-Hormone and the Heart." *Endocrine Reviews* **15**(5): 555-573.
- Sachar, E. J., G. Mushrush, M. Perlow, E. D. Weitzman y J. Sassin** (1972). "Growth hormone responses to L-dopa in depressed patients." *Science* **178**(4067): 1304-1305.
- Sáez, G.** (1999). "Changes in lipid profile and thyroid function in adults patients with hypopituitarism following treatment with growth hormone." *Med Clin* **113**: 775-779.
- Saint-Sauveur, D., S. F. Gauthier, Y. Boutin, A. Montoni y I. Fliss** (2009). "Effect of feeding whey peptide fractions on the immune response in healthy and Escherichia coli infected mice." *International Dairy Journal* **19**(9): 537-544.

Saita, E., K. Kondo y Y. Momiyama (2015). "Anti-Inflammatory Diet for Atherosclerosis and Coronary Artery Disease: Antioxidant Foods." *Clin Med Insights Cardiol* **8**(Suppl 3): 61-65.

Sanchez, A., D. A. Rubano, G. W. Shavlik, R. Hubbard y M. C. Horning (1988). "Cholesterolemic effects of the lysine/arginine ratio in rabbits after initial early growth." *Arch Latinoam Nutr* **38**(2): 229-238.

Sanz, A., P. Caro, J. Ibanez, J. Gomez, R. Gredilla y G. Barja (2005). "Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain." *J Bioenerg Biomembr* **37**(2): 83-90.

Sanz, A., R. Gredilla, R. Pamplona, M. Portero-Otin, E. Vara, J. A. Tresguerres y G. Barja (2005). "Effect of insulin and growth hormone on rat heart and liver oxidative stress in control and caloric restricted animals." *Biogerontology* **6**(1): 15-26.

Sastre, J., F. V. Pallardo y J. Vina (2003). "The role of mitochondrial oxidative stress in aging." *Free Radic Biol Med* **35**(1): 1-8.

Sattler, F. R. (2013). "Growth hormone in the aging male." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **27**(4): 541-555.

Scarabelli, T. M., E. Pasini, A. Stephanou, C. Chen-Scarabelli, L. Saravolatz, R. A. Knight, D. S. Latchman y J. M. Gardin (2004). "Nutritional supplementation with mixed essential amino acids enhances myocyte survival, preserving mitochondrial functional capacity during ischemia-reperfusion injury." *Am J Cardiol* **93**(8A): 35A-40A.

Schmucker, D. L. y H. Sanchez (2011). "Liver regeneration and aging: a current perspective." *Curr Gerontol Geriatr Res* **2011**: 526379.

Segard, H. B., S. Moulin, S. Boumard, C. Augier de Cremiers, P. A. Kelly y J. Finidori (2003). "Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts." *Cell Signal* **15**(6): 615-623.

Seiva, F. R., C. M. Berbert, G. A. Souza, K. K. Rocha, G. M. Ebaid, R. C. Burneiko y E. L. Novelli (2010). "Energy expenditure, lipid profile, oxidative stress, and cardiac energy metabolism after growth hormone treatment in obese young rats." *Horm Metab Res* **42**(7): 496-501.

Semsei, I. (2000). "On the nature of aging." *Mech Ageing Dev* **117**(1-3): 93-108.

Sen, C. K. y L. Packer (1996). "Antioxidant and redox regulation of gene transcription." *FASEB J* **10**(7): 709-720.

- Seve, B., O. Ballevre, P. Ganier, J. Noblet, J. Prugnaud y C. Obled** (1993). "Recombinant porcine somatotropin and dietary protein enhance protein synthesis in growing pigs." *J Nutr* **123**(3): 529-540.
- Shapiro, B. H., A. K. Agrawal y N. A. Pampori** (1995). "Gender Differences in Drug-Metabolism Regulated by Growth-Hormone." *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **27**(1): 9-20.
- Shin, S. J., K. Yamada, A. Sugisawa, K. Saito, T. Miyajima y K. Umegaki** (2002). "Enhanced oxidative damage induced by total body irradiation in mice fed a low protein diet." *Int J Radiat Biol* **78**(5): 425-432.
- Silverman, B. L. y J. R. Friedlander** (1997). "Is growth hormone good for the heart?" *Journal of Pediatrics* **131**(1): S70-S74.
- Simpson, H., R. Savine, P. Sonksen, B. A. Bengtsson, L. Carlsson, J. S. Christiansen, D. Clemmons, P. Cohen, R. Hintz, K. Ho, P. Mullis, I. Robinson, C. Strasburger, T. Tanaka, M. Thorner y G. R. S. Council** (2002). "Growth hormone replacement therapy for adults: into the new millennium." *Growth Horm IGF Res* **12**(1): 1-33.
- Sohal, R. S. y R. Weindruch** (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging." *Science* **273**(5271): 59-63.
- Solon-Biet, S. M., K. A. Walters, U. K. Simanainen, A. C. McMahon, K. Ruohonen, J. W. Ballard, D. Raubenheimer, D. J. Handelsman, D. G. Le Couteur y S. J. Simpson** (2015). "Macronutrient balance, reproductive function, and lifespan in aging mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(11): 3481-3486.
- Sonntag, W. E., C. Lynch, P. Thornton, A. Khan, S. Bennett y R. Ingram** (2000). "The effects of growth hormone and IGF-1 deficiency on cerebrovascular and brain ageing." *J Anat* **197 Pt 4**: 575-585.
- Sonntag, W. E., X. Xu, R. L. Ingram y A. D'Costa** (1995). "Moderate caloric restriction alters the subcellular distribution of somatostatin mRNA and increases growth hormone pulse amplitude in aged animals." *Neuroendocrinology* **61**(5): 601-608.
- Speakman, J. R. y S. E. Mitchell** (2011). "Caloric restriction." *Mol Aspects Med* **32**(3): 159-221.
- Spindler, S. R.** (2010). "Caloric restriction: from soup to nuts." *Ageing Res Rev* **9**(3): 324-353.
- St Pierre, J., J. A. Buckingham, S. J. Roebuck y M. D. Brand** (2002). "Topology of superoxide production from different sites in the respiratory chain." *J Biol Chem* **277**: 44784-44790.

- Stevens, R. C., S. M. Suzuki, T. B. Cole, S. S. Park, R. J. Richter y C. E. Furlong** (2008). "Engineered recombinant human paraoxonase 1 (rHuPON1) purified from *Escherichia coli* protects against organophosphate poisoning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(35): 12780-12784.
- Stewart, J. W., K. Koehler, W. Jackson, J. Hawley, W. Wang, A. Au, R. Myers y D. F. Birt** (2005). "Prevention of mouse skin tumor promotion by dietary energy restriction requires an intact adrenal gland and glucocorticoid supplementation restores inhibition." *Carcinogenesis* **26**(6): 1077-1084.
- Strehler, B. L.** (1962). *Time, cells and aging*. New York, Academic Press.
- Strehler, B. L.** (1982). "Ageing: concepts and theories." *Lectures on gerontology*: 1-7.
- Stroikin, Y., H. Dalen, U. T. Brunk y A. Terman** (2005). "Testing the "garbage" accumulation theory of ageing: mitotic activity protects cells from death induced by inhibition of autophagy." *Biogerontology* **6**(1): 39-47.
- Suarez, R. K., C. A. Darveau y J. J. Childress** (2004). "Metabolic scaling: a many-splendoured thing." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **139**(3): 531-541.
- Suzuki, Y. J., H. J. Forman y A. Sevanian** (1997). "Oxidants as stimulators of signal transduction." *Free Radic Biol Med* **22**(1-2): 269-285.
- Takahashi, Y.** (2012). "Essential roles of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the liver." *Endocr J* **59**(11): 955-962.
- Takahashi, Y., K. Iida, K. Takahashi, S. Yoshioka, H. Fukuoka, R. Takeno, M. Imanaka, H. Nishizawa, M. Takahashi, Y. Seo, Y. Hayashi, T. Kondo, Y. Okimura, H. Kaji, R. Kitazawa, S. Kitazawa y K. Chihara** (2007). "Growth hormone reverses nonalcoholic steatohepatitis in a patient with adult growth hormone deficiency." *Gastroenterology* **132**(3): 938-943.
- Tanimoto, N., Y. Kumon, T. Suehiro, S. Ohkubo, Y. Ikeda, K. Nishiya y K. Hashimoto** (2003). "Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis." *Life Sci* **72**(25): 2877-2885.
- Tavares, A. B., E. Micmacher, S. Biesek, R. Assumpcao, R. Redorat, U. Veloso, M. Vaisman, P. T. Farinatti y F. Conceicao** (2013). "Effects of Growth Hormone Administration on Muscle Strength in Men over 50 Years Old." *Int J Endocrinol* **2013**: 942030.
- Terman, A. y U. T. Brunk** (1998). "Ceroid/lipofuscin formation in cultured human fibroblasts: the role of oxidative stress and lysosomal proteolysis." *Mech Ageing Dev* **104**(3): 277-291.

Thigpen, J. E., K. D. Setchell, K. B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G. F. Caviness, M. F. Goelz, J. K. Haseman, R. R. Newbold y D. B. Forsythe (1999). "Phytoestrogen content of purified, open- and closed-formula laboratory animal diets." *Lab Anim Sci* **49**(5): 530-536.

Thigpen, J. E., K. D. Setchell, M. F. Goelz y D. B. Forsythe (1999). "The phytoestrogen content of rodent diets." *Environ Health Perspect* **107**(4): A182-183.

Thorngren, K. G. y L. I. Hansson (1974). "Bioassay of growth hormone, I, Determination of longitudinal bone growth with tetracycline in hypophysectomized rats." *Acta Endocrinol (Copenh)* **75**(4): 653-668.

Tomas, M., M. Senti, F. Garcia-Faria, J. Vila, A. Torrents, M. Covas y J. Marrugat (2000). "Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(9): 2113-2119.

Toogood, A. A., R. M. Nass, S. S. Pezzoli, P. A. O'Neill, M. O. Thorner y S. M. Shalet (1997). "Preservation of growth hormone pulsatility despite pituitary pathology, surgery, and irradiation." *J Clin Endocrinol Metab* **82**(7): 2215-2221.

Toyomizu, M., K. Hayashi, K. Yamashita y Y. Tomita (1988). "Response surface analyses of the effects of dietary protein on feeding and growth patterns in mice from weaning to maturity." *J Nutr* **118**(1): 86-92.

Toyomizu, M., S. Kimura, K. Hayashi y Y. Tomita (1989). "Body protein and energy accretion in response to dietary protein level in mice from weaning to maturity." *J Nutr* **119**(7): 1028-1033.

Trenkle, A. (1978). "Relation of hormonal variations to nutritional studies and metabolism of ruminants." *J Dairy Sci* **61**(3): 281-293.

Trepanowski, J. F., R. E. Canale, K. E. Marshall, M. M. Kabir y R. J. Bloomer (2011). "Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings." *Nutr J* **10**: 107.

Tresguerres, I. F., L. Blanco, C. Clemente y J. A. Tresguerres (2003). "Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae." *Int J Oral Maxillofac Implants* **18**(6): 807-811.

Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic y M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* **160**(1): 1-40.

van Buul-Offers, S., C. M. Hoogerbrugge, J. Branger, M. Feijlbrief y J. L. Van den Brande (1988). "Growth-stimulating effects of somatomedin-/insulin-like peptides in Snell dwarf mice." *Horm Res* **29**(5-6): 229-236.

Van Cauter, E., R. Leproult y L. Plat (2000). "Age-related changes in slow wave sleep and REM sleep and relationship with growth hormone and cortisol levels in healthy men." *JAMA* **284**(7): 861-868.

van Vught, A. J., A. G. Nieuwenhuizen, M. A. Veldhorst, R. J. Brummer y M. S. Westerterp-Plantenga (2010). "The effects of dietary protein on the somatotrophic axis: a comparison of soy, gelatin, alpha-lactalbumin and milk." *Eur J Clin Nutr* **64**(5): 441-446.

Vann, R. C., H. V. Nguyen, P. J. Reeds, D. G. Burrin, M. L. Fiorotto, N. C. Steele, D. R. Deaver y T. A. Davis (2000). "Somatotropin increases protein balance by lowering body protein degradation in fed, growing pigs." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**(3): E477-483.

Veldhuis, J. D., D. Erickson, A. Iranmanesh, J. M. Miles y C. Y. Bowers (2005). "Sex-steroid control of the aging somatotrophic axis." *Endocrinol Metab Clin North Am* **34**(4): 877-893, viii.

Veyrat-Durebex, C. y J. Alliot (1997). "Changes in pattern of macronutrient intake during aging in male and female rats." *Physiol Behav* **62**(6): 1273-1278.

Veyrat-Durebex, C., P. Gaudreau, V. Coxam, N. Gaumet y J. Alliot (1999). "Peripheral injection of growth hormone stimulates protein intake in aged male and female Lou rats." *Am J Physiol* **276**(6 Pt 1): E1105-1111.

Vijayakumar, A., R. Novosyadlyy, Y. Wu, S. Yakar y D. LeRoith (2010). "Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism." *Growth Horm IGF Res* **20**(1): 1-7.

Vitetta, L. y B. Anton (2007). "Lifestyle and nutrition, caloric restriction, mitochondrial health and hormones: scientific interventions for anti-aging." *Clin Interv Aging* **2**(4): 537-543.

Volpi, E., B. Mittendorfer, S. E. Wolf y R. R. Wolfe (1999). "Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction." *Am J Physiol* **277**(3 Pt 1): E513-520.

Ward, W. y A. Richardson (1991). "Effect of age on liver protein synthesis and degradation." *Hepatology* **14**(5): 935-948.

Warner, H. R., R. J. Hodes y K. Pocinki (1997). "What does cell death have to do with aging?" *J Am Geriatr Soc* **45**(9): 1140-1146.

Waters, M. J., H. N. Hoang, D. P. Fairlie, R. A. Pelekanos y R. J. Brown (2006). "New insights into growth hormone action." *J Mol Endocrinol* **36**(1): 1-7.

Webster, a. s. f. (1972). "Selection for leanness and energetic efficiency of growth in meat animals." *Proc. Nutr. Soc* **36**: 53-59.

Weindruch, R. (1996). "The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates." *Toxicol Pathol* **24**(6): 742-745.

White, H. D., A. M. Ahmad, R. Guzder, A. M. Wallace, W. D. Fraser y J. P. Vora (2003). "Gender variation in leptin circadian rhythm and pulsatility in adult growth hormone deficiency: effects of growth hormone replacement." *Clin Endocrinol (Oxf)* **58**(4): 482-488.

White, R. M., E. J. Schaefer y N. M. Papadopoulos (1983). "The effect of growth hormone administration on lipids and lipoproteins in growth hormone-deficient patients." *Proc Soc Exp Biol Med* **173**(1): 63-67.

Yamazaki, T., E. Sasaki, C. Kakinuma, T. Yano, S. Miura y O. Ezaki (2005). "Increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver DGAT1." *J Biol Chem* **280**(22): 21506-21514.

Yu, B. P., J. J. Chen, C. M. Kang, M. Choe, Y. S. Maeng y B. S. Kristal (1996). "Mitochondrial aging and lipoperoxidative products." *Ann N Y Acad Sci* **786**: 44-56.

Yu, B. P., E. J. Masoro, I. Murata, H. A. Bertrand y F. T. Lynd (1982). "Life span study of SPF Fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease." *J Gerontol* **37**(2): 130-141.

Yuan, R., S. W. Tsaih, S. B. Petkova, C. Marin de Evsikova, S. Xing, M. A. Marion, M. A. Bogue, K. D. Mills, L. L. Peters, C. J. Bult, C. J. Rosen, J. P. Sundberg, D. E. Harrison, G. A. Churchill y B. Paigen (2009). "Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels." *Aging Cell* **8**(3): 277-287.

Yuen, K. C. y D. B. Dunger (2006). "Impact of treatment with recombinant human GH and IGF-I on visceral adipose tissue and glucose homeostasis in adults." *Growth Horm IGF Res* **16 Suppl A**: S55-61.

Zapf, J. y E. R. Froesch (1986). "Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role." *Horm Res* **24**(2-3): 121-130.